

**Univerzita Karlova**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biochemie



**Bc. Karolína Honzejková**

Biofyzikální charakterizace N-koncové části proteinkinasy ASK1

Biophysical characterization of the N-terminal part of protein kinase ASK1

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: prof. RNDr. Tomáš Obšil, Ph.D.

Konzultanti diplomové práce: RNDr. Veronika Obšilová, Ph.D.  
Mgr. Matej Horváth, Ph.D.

Praha, 2019

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením svého školitele, prof. RNDr. Tomáše Obšila, Ph.D., a všechny použité prameny jsem řádně citovala.

V Praze dne: .....

Podpis: .....

## **Poděkování**

Děkuji svému školiteli, prof. Tomáši Obšilovi, Ph.D., a svým konzultantům, RNDr. Veronice Obšilové, Ph.D. a Mgr. Mateji Horváthovi, Ph.D., za odborné vedení, vstřícnost, trpělivost a ochotu v celém průběhu magisterského studia a při vyhotovování diplomové práce.

Děkuji celému kolektivu Laboratoře biofyzikální chemie proteinových komplexů a Laboratoře strukturní biologie signálních proteinů Akademie věd České republiky za vytvoření příjemných pracovních podmínek, obzvláště pak děkuji Mgr. Daně Kalábové za ochotu a rady v oblasti molekulární biologie a Mgr. Olívii Petrvalské, Ph.D. za zpracování AUC experimentů.

Velké poděkování patří také mým rodičům a blízkým za všestrannou podporu během celého studia.

## Abstrakt

Proteinkinasa ASK1 (z anglického „apoptosis signal-regulating kinase 1“) je apikální kinasa mitogeny aktivované proteinkinasové kaskády (tzv. MAPK kaskády). Její aktivita je spouštěna např. reaktivními formami kyslíku, cytokiny, stresem endoplasmatického retikula či osmotickým stresem. Aktivace ASK1 má za následek spuštění metabolických drah, na jejichž počátcích stojí mitogeny aktivované proteinkinasy (MAPK) p38 a c-Jun N-koncová kinasa (JNK). Aktivace těchto kinas vede k zánětu nebo smrti buňky. Dysregulace ASK1 je asociována s rozvojem patologických stavů, jakými jsou neurodegenerativní, kardiovaskulární či nádorová onemocnění, což z tohoto proteinu činí potenciální cíl terapeutických zásahů. Aktivita proteinkinasy ASK1 je regulována prostřednictvím protein-proteinových interakcí, mezi hlavní negativní regulátory ASK1 řadíme rodinu dimerních proteinů 14-3-3 a redoxní protein thioredoxin 1. Příkladem pozitivních regulátorů jsou faktory asociované s TNF receptorem. Kromě toho je aktivita ASK1 přísně regulována prostřednictvím oligomerizace. Navzdory neustálému pokroku, kterého je dosahováno v rámci studia tohoto proteinu, je přesný molekulární mechanismus regulace ASK1 a vliv oligomerizace na tento proces nejasný, částečně z důvodu nedostatku strukturních dat. Interakce N-koncových částí dvou protomerů v rámci dimeru ASK1 je jedním z klíčových kroků aktivace ASK1. Bylo ukázáno, že izolovaná katalytická doména ASK1 (ASK1-CD) tvoří stabilní dimery. Nedávná studie však naznačila, že delší varianta tohoto proteinu obsahující kromě ASK1-CD také doménu vázající thioredoxin (ASK1-TBD) a centrální regulační doménu (ASK1-CRR) je v roztoku monomer. Pro objasnění tohoto rozporu jsme se rozhodli provést biofyzikální charakterizaci N-koncové části ASK1 a zejména prostudovat oligomerní chování tohoto proteinu.

Cílem této práce byla biofyzikální analýza proteinu ASK1 složeného z ASK1-CRR a ASK1-CD. Analýza pomocí analytické ultracentrifugace naznačila koncentračně závislou dimerizaci, což bylo následně potvrzeno malouhlovým rozptylem rentgenového záření. Pro stavbu modelů monomeru ASK1-CRR-CD založených na rozptylových křivkách byl využit software CORAL. Chemické zesílení spojené s hmotnostní spektrometrií bylo následně využito pro získání vzdálenostních omezení užitečných pro posouzení plauzibility strukturních modelů. Data získaná za využití biofyzikálních metod ukazují, že nejen samotná katalytická doména proteinkinasy ASK1, ale i protein ASK1-CRR-CD v roztoku dimerizuje.

**Klíčová slova:** ASK1, proteinkinasa, dimerizace, SAXS, chemické zesílení

## Abstract

Apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) is an apical kinase of the mitogen-activated protein kinase cascade. Its activity is triggered by various stress stimuli such as reactive oxygen species (ROS), cytokines, endoplasmic reticulum (ER) stress or osmotic stress resulting in the activation of p38 and c-Jun N-terminal kinase metabolic pathways and leading to inflammation or cell death. Dysregulation of ASK1 is linked to several pathologies such as neurodegenerative and cardiovascular diseases and cancer, which makes this protein a potential target of therapeutic intervention. The activity of ASK1 is regulated through protein-protein interactions with 14-3-3 proteins and thioredoxin1 being among the most important negative regulators and tumour necrosis factor receptor-associated factors being an example of positive regulators. Apart from that, ASK1 is also tightly regulated via oligomerization. Despite continual progress being made, the precise molecular mechanism of ASK1 regulation and the role of ASK1 oligomerization in this process still remains unclear to this day owing to the lack of structural data. Interaction of the N-terminal parts of two protomers of ASK1 dimer is one of the key steps in ASK1 activation. It was shown, that the isolated ASK1 catalytic domain (ASK1-CD) forms stable dimers. However, a recent study implied that a longer variant of this protein including also thioredoxin-binding domain (ASK1-TBD) and central regulatory domain (ASK1-CRR) is a monomer. We decided to perform a biophysical characterization of the ASK-1 N-terminal part, especially to study the oligomeric behaviour of this protein, to elucidate this discrepancy.

The aim of this work was a biophysical analysis of ASK1 protein consisting of its central regulatory region (ASK1-CRR) and catalytic domain (ASK1-CD). Analytical ultracentrifugation analysis indicated a dimer formation in a concentration-dependent manner, which was subsequently confirmed by small angle X-ray scattering (SAXS). CORAL software was applied to build models of ASK1 monomers based on experimental scattering curves. Chemical crosslinking coupled to mass spectrometry was used as a complementary method to obtain distance restraints for further refinement of SAXS-based structural models. The data we obtained from various biophysical methods suggest, that not only the isolated catalytic domain, but also ASK1-CRR-CD protein can form dimers in solution.

**Key words:** ASK1, protein kinase, dimerization, SAXS, cross-linking

# Obsah:

<b>Abstrakt .....</b>	<b>4</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>5</b>
<b>Seznam použitých zkratek .....</b>	<b>8</b>
<b>1. Přehled literatury .....</b>	<b>10</b>
1.1 Proteinkinasy .....	10
1.1.1 Mitogeny aktivované proteinkinasové signální kaskády .....	13
1.2 Proteinkinasa ASK1.....	13
1.2.1 Doménová struktura proteinkinasy ASK1.....	15
1.2.1.1 Centrální regulační oblast proteinu ASK1 .....	16
1.2.1.2 Katalytická doména proteinu ASK1 .....	17
1.2.2 Regulace proteinkinasy ASK1 .....	18
1.2.2.1 Regulace prostřednictvím TRX1 .....	19
1.2.2.2 Regulace prostřednictvím proteinu 14-3-3.....	20
<b>2. Cíl práce .....</b>	<b>23</b>
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>24</b>
3.1 Materiál.....	24
3.1.1 Chemikálie a enzymy .....	24
3.1.2 Další materiál .....	25
3.1.3 Přístroje .....	26
3.2 Příprava konstruktů pro expresi ASK1-CRR-CD.....	27
3.2.1 Sekvence ASK1 .....	27
3.2.2 Expresní vektory .....	27
3.2.3 Amplifikace genu ASK1-CRR-CD .....	29
3.2.4 Štěpení PCR produktů a expresních vektorů restrikčními enzymy .....	32
3.2.5 Elektroforéza .....	33
3.2.6 Extrakce DNA z agarosového gelu .....	34
3.2.7 Ligace ASK1 (269-973) do pRSFDuet-1/pST39 .....	35
3.2.8 Transformace .....	36
3.2.9 PCR z bakteriálních kolonií .....	36
3.2.10 Kultivace bakterií a izolace plasmidové DNA .....	38
3.2.11 PCR vnášející mutaci .....	39
3.3 Optimalizace exprese konstruktů ASK1-CRR-CD.....	40
3.3.1 Transformace do <i>E. Coli</i> BL21 (DE3) .....	40
3.3.2 Kultivace bakterií a příprava zásobních glycerolových stoků .....	41
3.3.3 Optimalizace exprese ASK1-CRR-CD .....	41

3.4	Expres a purifikace proteinu ASK1-CRR-KD v pRSFDuet-1 .....	41
3.4.1	Kultivace bakterií .....	41
3.4.2	Centrifugace a resuspendace bakteriální kultury .....	42
3.4.3	Příprava buněčného lyzátu .....	42
3.4.4	Centrifugace buněčného lyzátu .....	43
3.4.5	Niklová chelatační chromatografie .....	43
3.4.6	SDS-PAGE elektroforéza .....	44
3.4.7	Dialýza .....	46
3.4.8	Koncentrace ASK1-CRR-CD .....	47
3.4.9	Gelová permeační chromatografie .....	47
3.5	Biofyzikální a strukturní charakterizace ASK1-CRR-CD .....	48
3.5.1	Analytická ultracentrifugace .....	48
3.5.2	Maloúhlový rozptyl rentgenového záření .....	49
3.5.3	Modelování ASK1-CRR-CD metodou „rigid body“ .....	52
3.5.4	Chemické zesílení spojené s hmotnostní spektrometrií .....	53
<b>4.</b>	<b>Výsledky .....</b>	<b>56</b>
4.1	Příprava plasmidu pRSFDuet-1/pST39 s vloženou sekvencí pro ASK1-CRR-CD .....	56
4.1.1	Amplifikace cílového genu pomocí PCR .....	56
4.1.2	Příprava dvojité štěpených plasmidů pRSFDuet-1/pST39 .....	57
4.1.3	Ligace ASK1 269-973 do plasmidů pRSFDuet-1/pST39 .....	58
4.1.4	Mutace pro vnesení stop kodonu na pozici S942 .....	60
4.2	Optimalizace expresních podmínek konstruktů ASK1-CRR-CD .....	60
4.3	Purifikace proteinu ASK1-CRR-CD .....	63
4.3.1	Niklová chelatační chromatografie .....	63
4.3.2	Gelová permeační chromatografie .....	65
4.4	Analýza oligomerního chování ASK1-CRR-CD metodou sedimentační rychlosti .....	66
4.5	Analýza ASK1-CRR-CD metodou SAXS .....	68
4.6	Modelování monomeru ASK1-CRR-CD .....	70
4.7	Chemické zesílení spojené s hmotnostní spektrometrií .....	75
<b>5.</b>	<b>Diskuze .....</b>	<b>78</b>
<b>6.</b>	<b>Závěr .....</b>	<b>81</b>
	<b>Zdroje .....</b>	<b>82</b>
	<b>Příloha 1 .....</b>	<b>88</b>

## Seznam použitých zkratek

<b>APS</b>	peroxodisíran amonný
<b>ASK1</b>	z angl. „apoptosis signal-regulating kinase 1“
<b>ASK1-CD</b>	katalytická doména lidské proteinkinasy ASK1
<b>ASK1-CRR</b>	centrální regulační oblast lidské proteinkinasy ASK1
<b>ASK1-CRR-CD</b>	konstrukt lidské proteinkinasy ASK1 obsahující příslušné domény
<b>ASK1-TBD</b>	thioredoxin-vazebná doména lidské proteinkinasy ASK1
<b>ATP</b>	adenosin trifosfát
<b>bp</b>	pár basí
<b>cDNA</b>	chromosomální DNA
<b>dATP</b>	deoxyadenosin trifosfát
<b>dCTP</b>	deoxycytidin trifosfát
<b>dGTP</b>	deoxyguanosin trifosfát
<b>DNA</b>	deoxyribonukleová kyselina
<b>dNTP</b>	deoxynukleotid trifosfát
<b>DSS</b>	disukcinimidyl suberát
<b>DSG</b>	disukcinimidyl glutarát
<b>dTTP</b>	deoxythymidin trifosfát
<b>EDTA</b>	ethylendiamintetraoctová kyselina
<b>GB1</b>	podjednotka $\beta$ proteinu G
<b>HEPES</b>	2-(4-(2-hydroxyethyl)piperazin-1-yl)ethansulfonová kyselina
<b>IPTG</b>	isopropyl- $\beta$ -D-thiogalaktopyranosid
<b>JNK</b>	c-Jun N-terminální kinasa
<b>kD</b>	kilo dalton
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>MAPK</b>	mitogeny aktivovaná proteinkinasa
<b>MAP2K/MKK</b>	mitogeny aktivovaná proteinkinasa kinasa
<b>MAP3K/MKKK</b>	mitogeny aktivovaná proteinkinasa kinasa kinasa
<b>NTA</b>	nitrilotrioctová kyselina
<b>PAGE</b>	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
<b>PBS</b>	fosfátový pufr



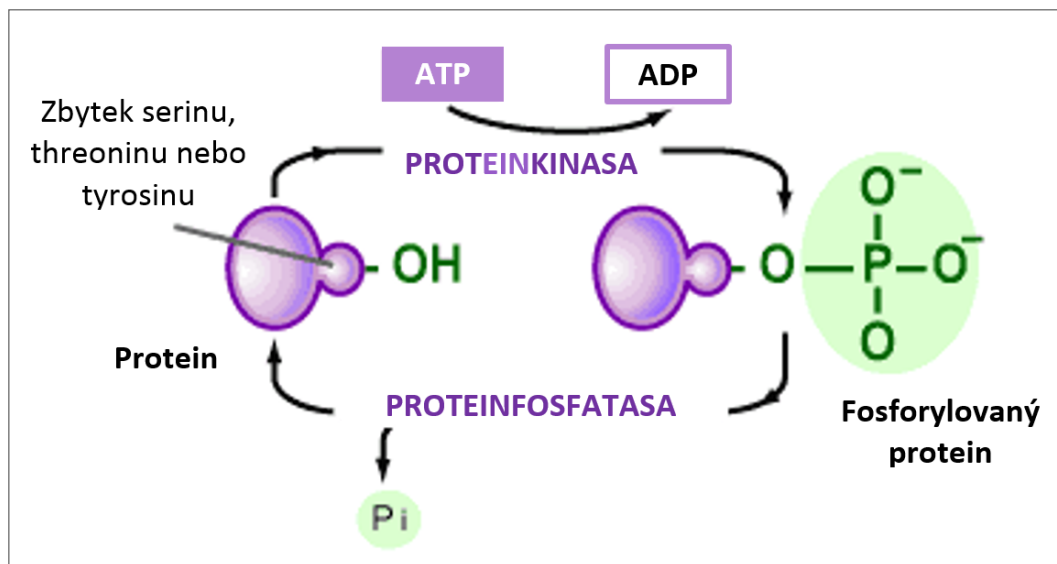
<b>PCR</b>	polymerasová řetězová reakce
<b>PH</b>	z angl. „pleckstrin homology“
<b>PMSF</b>	fenylmethylsulfonyl fluorid
<b>ROS</b>	reaktivní formy kyslíku
<b>RPM</b>	otáčky za minutu
<b>SAXS</b>	maloúhlový rozptyl rentgenového záření
<b>SDS</b>	dodecylsíran sodný
<b>TAE</b>	Tris/acetát/EDTA
<b>TB</b>	z angl. „terrific broth“
<b>TCEP</b>	tris(2-karboxyethyl) fosfin
<b>TEMED</b>	N, N, N', N' - tetraethylendiamin
<b>TEV</b>	virus tabákové mozaiky
<b>TNF</b>	z angl. „tumor necrosis factor“
<b>TPR</b>	z angl. „tetratricopeptide repeat“
<b>TRAF</b>	faktor asociovaný s TNF-receptorem
<b>TRX</b>	thioredoxin
<b>βME</b>	β-merkapt ethanol

# 1. Přehled literatury

## 1.1 Proteinkinasy

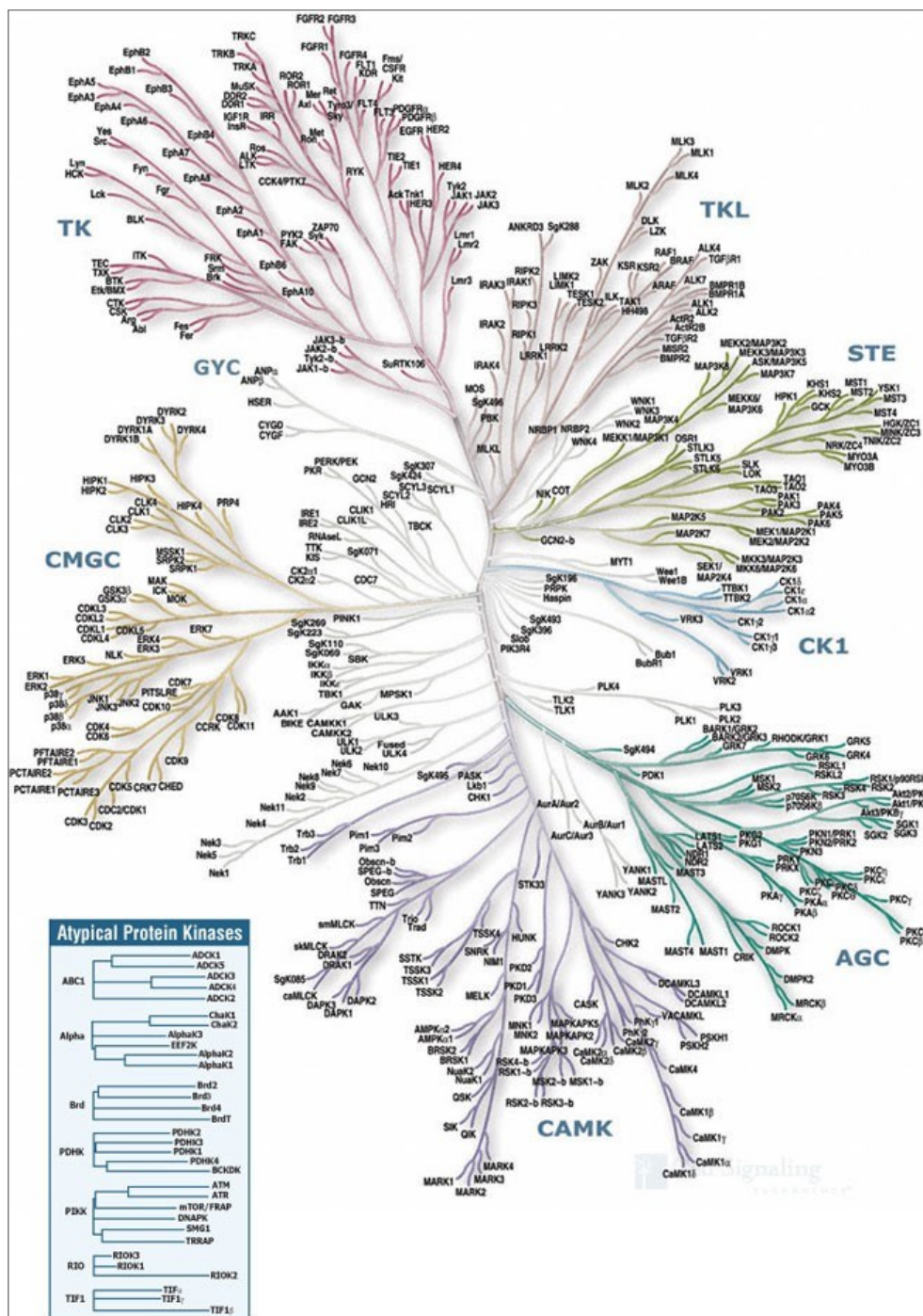
Kovalentní vazba fosfátové skupiny na postranní řetězce aminokyselin v proteinech je jednou z alternativ, kterou využívají eukaryotické buňky pro regulaci funkce proteinů [1]. Enzymy, které katalyzují fosforylaci hydroxylových skupin těchto aminokyselin, nejčastěji serinu, threoninu a tyrosinu, se nazývají proteinkinasy, a řadí se do třídy transferas. V lidském genomu existuje více než 500 genů kódujících proteinkinasy [2]. Jejich rozdělení do rodin podle evoluční příbuznosti je zobrazeno na obrázku 1.2 (str. 12).

Fosforylace je nejčastější posttranslační modifikací a kovalentní vazba fosfátové skupiny, jejíž donorem je obvykle ATP, hraje důležitou roli při regulaci biologické funkce proteinů a přenosu signálu v buňce [3, 4]. Přítomnost dvou negativních nábojů ve fosfátové skupině se může významně podílet na konformačních změnách v molekule proteinu – negativní náboje mohou například přitahovat pozitivně nabitě postranní řetězce aminokyselin [1]. Protichůdný efekt mají enzymy ze skupiny proteinfosfatas, které naopak fosfátovou skupinu z proteinů odštěpují [3].



**Obrázek 1.1** Reverzibilní fosforylace proteinového substrátu. Přenos fosfátové skupiny na postranní řetězec aminokyselin (nejčastěji serinu, threoninu a tyrosinu), jejímž donorem je obvykle molekula ATP, je katalyzován enzymy ze skupiny proteinkinas. Protichůdnou reakci katalyzují proteinfosfatas, které naopak fosfátovou skupinu odstraňují. Upraveno dle [5].

Mechanismus vratné fosforylace a defosforylace je znázorněn na obrázku 1.1 (str. 10). Vratnou fosforylací proteinů je v eukaryotických buňkách zajištěna regulace aktivity velkého množství proteinů, přičemž z asi 10 000 různých proteinů vyskytujících se v savčích buňkách dojde u více než třetiny z nich někdy k fosforylaci. V buňce existuje velké množství proteinkinas i proteinfosfatas, z nichž některé vykazují vysokou specifitu k proteinu, který je modifikován, některé působí na širší skupinu proteinů. Aktuální fosforylační stav proteinu závisí na množství proteinkinas a proteinfosfatas v danou chvíli na proteinovou molekulu působící. Čím rychleji dochází k přepínání z fosforylovaného stavu na defosforylovaný, tím rychleji může buňka reagovat na příchozí podněty. Zatímco u některých proteinů dochází po fosforylaci proteinkinasou ke zvýšení aktivity, u jiných proteinů může naopak docházet ke snížení aktivity. Výsledný efekt závisí na místě fosforylace a také na struktuře daného proteinu [1].



**Obrázek 1.2** Fylogenetický strom zobrazující sekvenční podobnost mezi katalytickými doménami lidských proteinkinas. Na obrázku je barevně odlišeno sedm hlavních skupin proteinkinas – jedná se o skupiny AGC (pojmenováno podle rodin proteinkinas A, G a C), CAMK (Ca<sup>2+</sup>/kalmodulin dependentní kinas), CK1 (kaseinkinas 1), CMGC (pojmenováno podle začátečních písmen některých z kinas, zahrnuje MAPK růstové a stresové kinas a cyklin-dependentní kinas důležité pro regulaci buněčného cyklu), STE (homology kvasinkových kinas Sterile 7, Sterile 11 a Sterile 20), TK (tyrosinkinas) a TKL (z angl. „tyrosin kinase-like“). Převzato z [2].

### 1.1.1 Mitogeny aktivované proteinkinasové signální kaskády

Všechny živé organismy musí být schopny reagovat na různé druhy stresu tak, aby si byly schopny zachovat stálost vnitřního prostředí. Odpovědi na stres jsou přenášeny z molekulární úrovně na úroveň celého organismu. Při nesprávných reakcích na stres často dochází k poruchám regulace buněčné smrti, proliferace či zánětu, což je spojeno se vznikem mnoha nemocí. Z toho důvodu je systém zajišťující reakci na stres velmi komplikovaný a buněčná signalizace je zprostředkována velkým množstvím mediátorů [6].

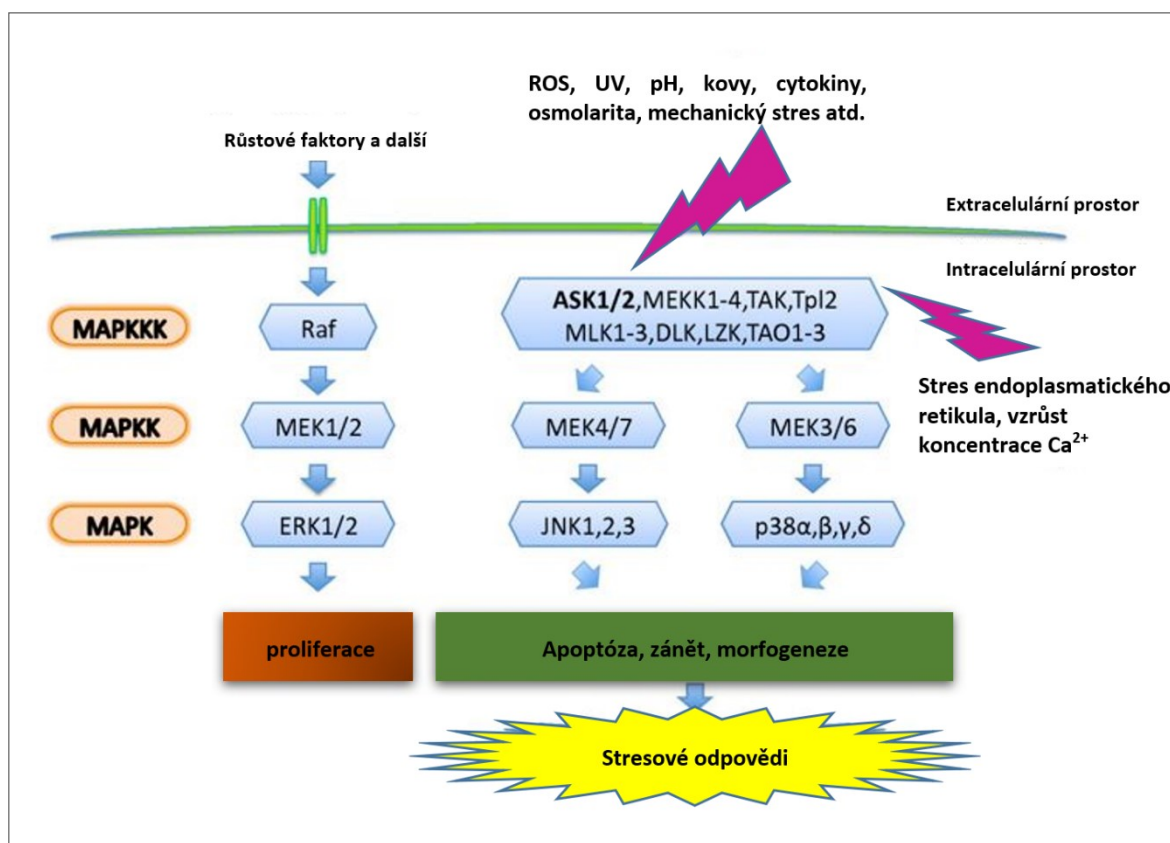
Metabolické cesty přenášející signál, které zodpovídají za reakci na stres, jsou přísně regulovány redoxním stavem v buňce. Výsledný redoxní stav buňky je založen na přesné rovnováze mezi hladinou redukčních a oxidačních ekvivalentů. Produkce ROS kolísá v závislosti na změnách vnějšího i vnitřního prostředí buňky a v návaznosti na to dochází k aktivaci specifických signálních kaskád včetně mitogeny aktivovaných proteinkinas, které rozhodují o tom, zda buňka přežije, nebo dojde k smrti buňky [7].

Mitogeny aktivované proteinkinasy (MAPK – z anglického „mitogen-activated protein kinase“) jsou serin/threonin proteinkinasy, které jsou aktivovány řadou stimulů, například cytokiny, růstovými faktory, neuropřenašeči, hormony či buněčným stresem [6]. MAPK kaskáda je signalizační dráha konzervovaná napříč živočišnými druhy. Je tvořena třemi úrovněmi proteinkinas: MAPK, MAPK kinasami (MAP2K/MAPKK) a MAP2K kinasami (MAP3K/MAPKKK) [6, 8]. MAP3K fosforyluje a aktivuje MAP2K, která následně fosforyluje a aktivuje MAPK. Aktivovaná MAPK poté může fosforylovat řadu dalších substrátů, včetně transkripčních faktorů, a tím regulovat buněčnou odpověď [6]. Výsledek MAPK signalizace závisí na řadě faktorů včetně subcelulární lokalizace daných MAPK, délce a rozsahu jejich aktivace a také na signálech pocházejících z dalších signalizačních drah [9].

## 1.2 Proteinkinasa ASK1

Proteinkinasa ASK1 (z anglického „apoptosis signal-regulating kinase 1“), která je součástí rodiny proteinkinas MAP3K, byla objevena jako aktivátor MAPK p38 a c-Jun N-koncové kinasy (JNK – z anglického „c-Jun amino-terminal kinase“), které aktivuje prostřednictvím fosforylace „downstream“ MAP2K MKK3/MKK6 a MKK4/MKK7, jak je znázorněno na obrázku 1.3 (str. 14) [10].

K aktivaci proteinkinasy ASK1 dochází v buňkách vystavených působení nejrůznějších stimulů, jakými je například oxidační stres, faktor nádorové nekrosy  $\alpha$  (TNF $\alpha$  – z anglického „tumor necrosis factor  $\alpha$ “), lipopolysacharidy, stres endoplasmatického retikula či příliv vápenatých iontů, přičemž jako nejúčinnější spouštěč se z těchto stimulů jeví být oxidační stres [11]. Zvýšená exprese proteinkinasy ASK1 je spojena se zvýšenou indukcí buněčné smrti za experimentálních podmínek [10].



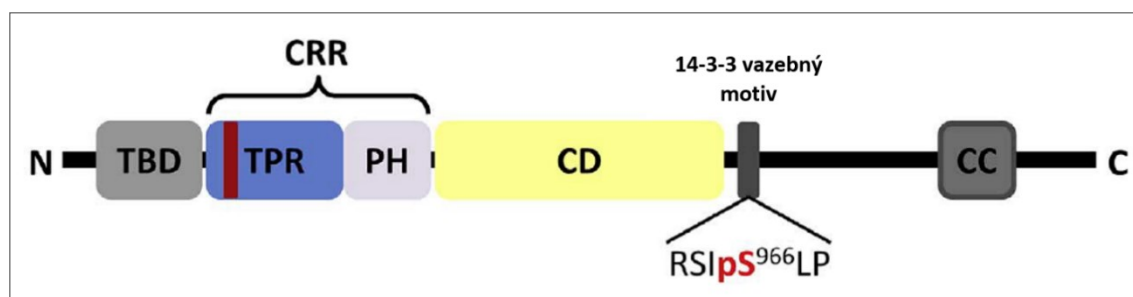
**Obrázek 1.3** Savčí MAPK signalizační kaskády. Proteinkinasy ASK1/2 se řadí mezi MAPKKK kinasы stojící na vrcholu MAPK signalizační kaskády a reagují na různé formy stresu. Jejich aktivaci dochází k přenosu signálu přes úroveň MAP2K kinas až na MAPK kinasы JNK a p38, v návaznosti na což dochází ke spuštění příslušných metabolických drah. Upraveno dle [17].

Aktivita ASK1 již byla spojena s řadou onemocnění. Zdá se, že ASK1 je evolučně konzervovaným prvkem majícím význam pro ochranu hostitele před některými patogeny a má také kritickou roli u některých zánětlivých onemocnění [12], dále hraje roli v odpovědích vrozené imunity [13], je aktivována u řady kardiovaskulárních chorob sahajících od vysokého krevního tlaku až po srdeční selhání [14] a v neposlední řadě je spojena se vznikem neurodegenerativních onemocnění, jejichž rozvoj je silně spojen s oxidačním stresem. Konkrétně se jedná např. o Alzheimerovu chorobu, Parkinsonovu chorobu, Huntingtonovu

chorobu, amyotrofickou laterální sklerózu, glaukom nebo roztroušenou sklerózu, které jsou charakteristické postupnou ztrátou neuronů a způsobují pacientům nevratná poškození [15]. Buněčná smrt vyvolaná ASK1 může mít jak pozitivní, tak negativní efekt na patogenezi onemocnění. Buněčná smrt vyvolaná prostřednictvím ASK1 v mozku se pojí se vznikem neurodegenerativních onemocnění, naopak v případě nádorových onemocnění či virových infekcí je buněčná smrt zprostředkovaná ASK1 důležitá a brání virům v replikaci a přežití. Kromě toho je aktivita ASK1 spojená se zánětem a buněčnou proliferací, přičemž oba tyto procesy mohou být zodpovědné za vznik nádorových a zánětlivých onemocnění. Je zjevné, že ASK1 se zásadním způsobem podílí na osudu buňky. Z toho důvodu v buňce existuje přísná regulace tohoto proteinu a při jejím porušení může docházet ke vzniku již zmíněných a mnohých dalších onemocnění [16].

### 1.2.1 Doménová struktura proteinkinasy ASK1

ASK1 je protein složený z 1 374 aminokyselin o relativní molekulové hmotnosti 154 500 [18]. Je tvořen třemi doménami (obr. 1.4): N-koncovou thioredoxin vazebnou doménou (ASK1-TBD), dále centrální regulační oblastí (ASK1-CRR), jejíž součástí je i oblast pro vazbu TRAF (z anglického „tumor necrosis factor-associated receptor“), a serin/threonin kinasovou doménou (ASK1-CD) nacházející se zhruba uprostřed molekuly proteinu. Za kinasovou doménou se dále směrem k C-konci nachází motiv zodpovědný za vazbu proteinu 14-3-3, který hraje důležitou roli v regulaci aktivity ASK1. Kromě toho se na C-konci nachází tzv. „coiled-coil“ motiv [19].

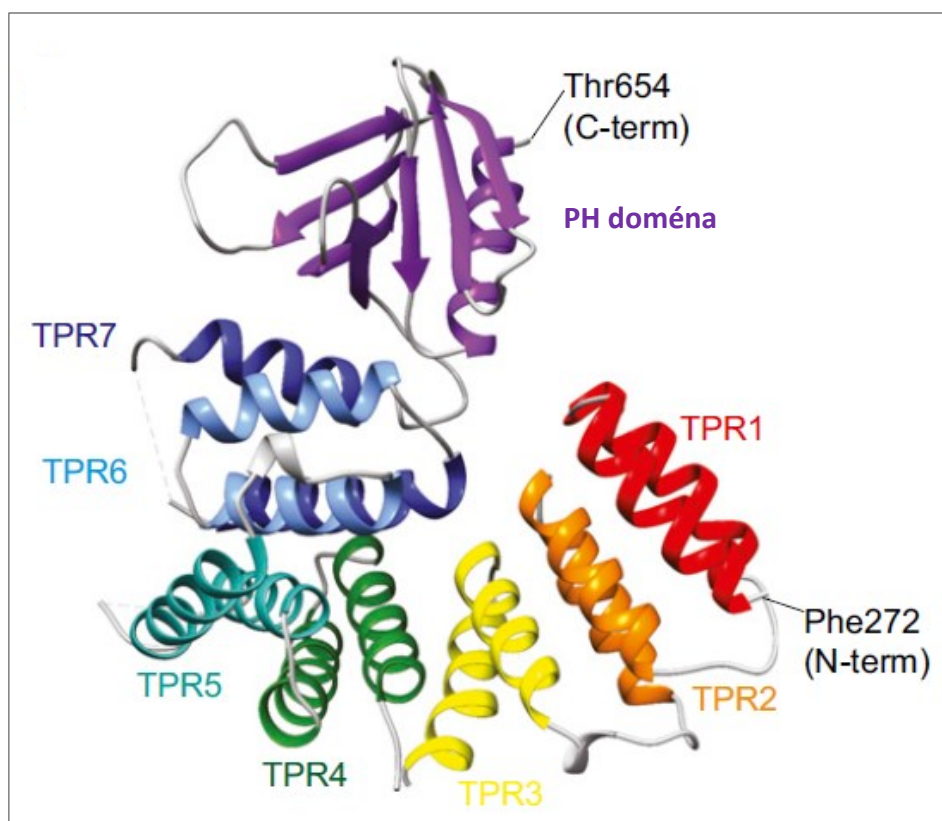


**Obrázek 1.4 Doménová struktura proteinkinasy ASK1.** Na schématu je znázorněna N-koncová TBD doména, CRR oblast dále složená z TPR (z angl. „tetratricopeptide repeat“) a PH (z angl. „pleckstrin homology“) domény, katalytická doména následovaná 14-3-3 vazebným motivem a C-koncový „coiled-coil“ motiv. Upraveno dle [19].



### 1.2.1.1 Centrální regulační oblast proteinu ASK1

Struktura centrálního regulačního regionu zahrnujícího rezidua 269-658 je složena ze dvou částí (obr. 1.5). První část se skládá ze 14 alfa-helixů, které dohromady tvoří 7 TPR strukturních motivů (TPR - z anglického „tetratricopeptide repeats“), druhá část je tvořena PH doménou (PH - z anglického „pleckstrin homology“). Zatímco v jiných proteinech obsahujících TPR region bývá tato oblast přítomna v extendovaném uspořádání, TPR region v ASK1 se odlišuje tím, že zaujímá kompaktní uspořádání, při kterém se rezidua vzájemně sekvenčně vzdálená dostávají do těsné blízkosti. PH doména ASK1 zaujímá typické uspořádání. Skládá se ze dvou antiparalelních beta-listů, které jsou následovány C-koncovým amfipatickým alfa-helixem. Od nejběžnějších PH domén se odlišuje pouze absencí tryptofanu uvnitř C-terminálního alfa-helixu [20].

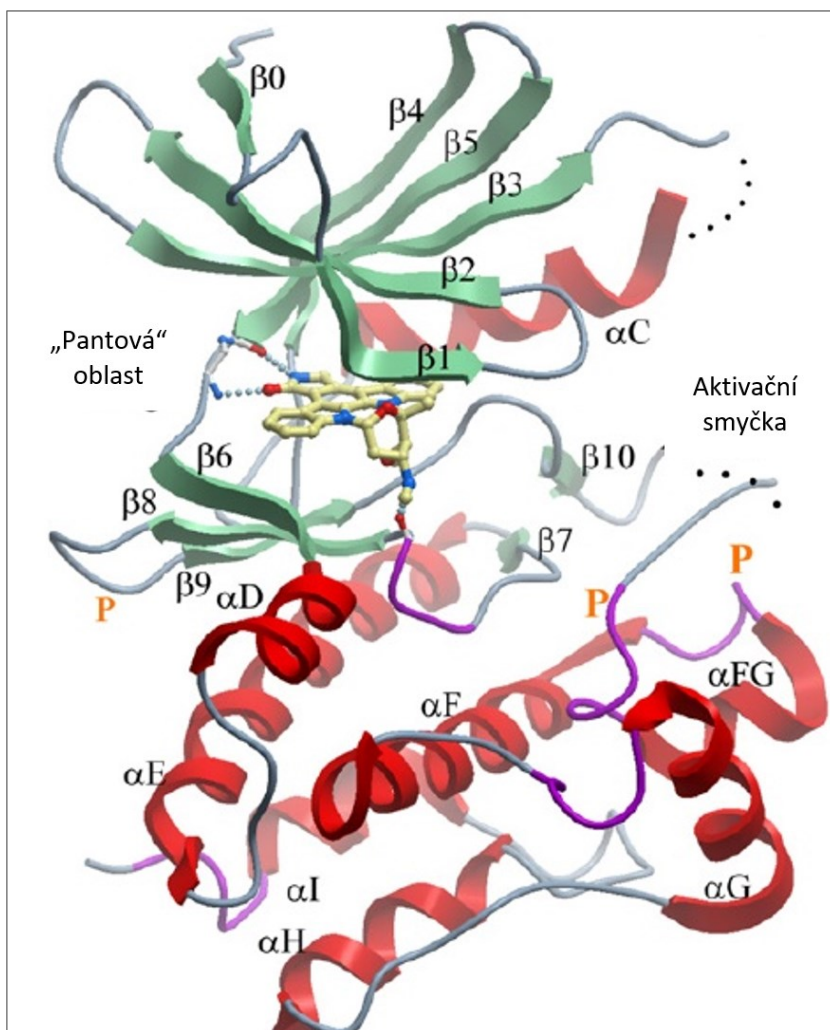


**Obrázek 1.5** Krystalová struktura centrální regulační oblasti proteinkinasy ASK1 znázorněná ve stuhové reprezentaci. Barevně jsou odlišeny elementy sekundární struktury –  $\alpha$ -helixy TPR domény a  $\beta$ -struktury a  $\alpha$ -C helix PH domény. Upraveno dle [20].



### 1.2.1.2 Katalytická doména proteinu ASK1

Katalytická doména proteinkinasy ASK1 (obr. 1.6) vykazuje typický proteinkinasový „fold“. Skládá se ze dvou laloků spojených flexibilní oblastí lemující ATP-vazebné místo. Malý lalok, zahrnující rezidua 670-757, je tvořený pěti beta-listy a alfa-C helixem. Velký lalok, zahrnující rezidua 761-940, je převážně alfa-helikální.



**Obrázek 1.6** Krystalová struktura katalytické domény proteinkinasy ASK1.

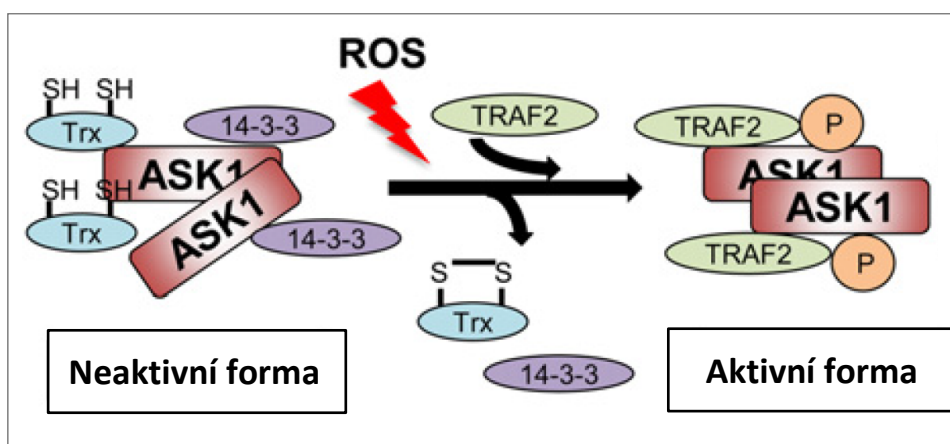
Na obrázku je zobrazen malý lalok tvořený pěti  $\beta$ -listy a  $\alpha$ -C helixem a převážně  $\alpha$ -helikální velký lalok. Katalytické ATP-vazebné místo se nachází mezi těmito dvěma laloky, zde je obsazeno kompetitivním inhibitorem ATP staurosporinem. Vodíkové vazby mezi staurosporinem a ASK1 jsou znázorněny tečkovaně. Upraveno dle [21].

Katalytická doména proteinu ASK1 tvoří pevné dimery, jejichž vznik je založen primárně na vzájemné tvarové komplementaritě, která existuje po celé délce proteinu. Dimerizace probíhá způsobem hlava-pata, to znamená, že N-koncová část jedné molekuly intereaguje s C-koncovou částí molekuly druhé [21].

### 1.2.2 Regulace proteinkinasy ASK1

Rodina proteinů ASK, do které patří kromě ASK1 také proteinkinasy ASK2 a ASK3 objevené později, je významným způsobem zapojena do signálních drah asociovaných s rozvojem mnohých onemocnění [6, 22, 23]. Z toho důvodu je aktivita proteinů rodiny ASK velmi pečlivě regulována, ať už na základě protein-proteinových interakcí či post-translačních modifikací [6].

ASK1 se v buňce vyskytuje v rámci velkého dynamického multiproteinového komplexu o molekulové váze 1500-2000 kDa zvaného ASK1 signalosom. Za přítomnosti reaktivních forem kyslíku (ROS – z anglického „reactive oxygen species“) a TNF- $\alpha$  se vytváří komplex o molekulové váze větší než 3000 kDa [24]. Ačkoliv přesné složení tohoto komplexu doposud nebylo určeno, bylo již v rámci něj identifikováno více než 90 proteinů interagujících s ASK1 [25].



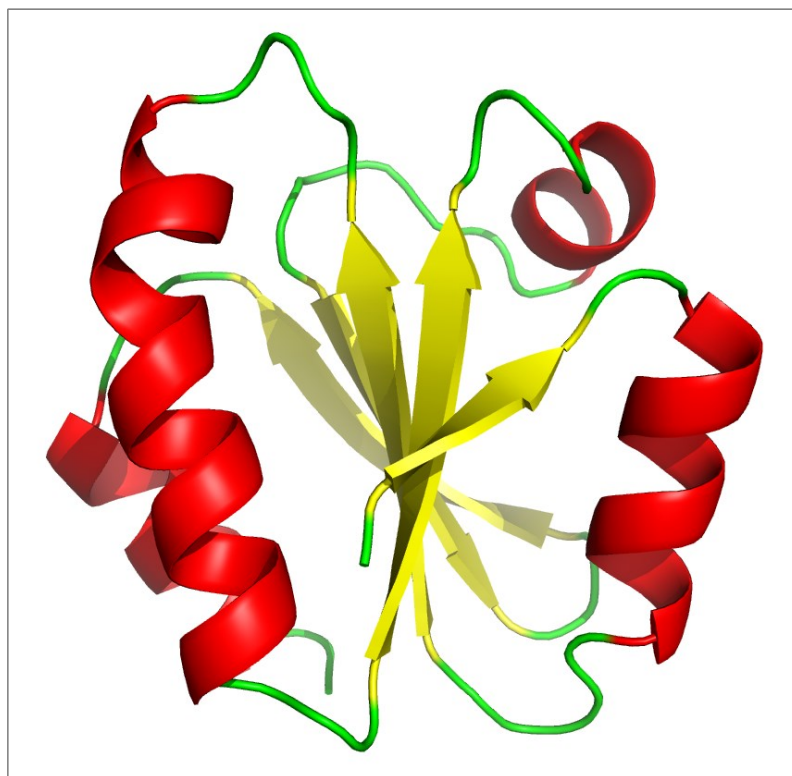
**Obrázek 1.7** *Aktivační mechanismus ASK1 v reakci na ROS. V neaktivním stavu tvoří ASK1 homooligomer díky interakci prostřednictvím C-koncového „coiled-coil“ motivu a v tomto stavu je udržována asociací s proteiny 14-3-3 a TRX. V reakci na ROS dochází k disociaci obou těchto proteinů, asociaci s TRAF2 a TRAF6 a vytvoření dalších interakcí mezi N-koncovými segmenty ASK1. Upraveno dle [24].*

Podle současného modelu ASK1 za nestresových podmínek vytváří homooligomerní komplex, přičemž k vzájemné interakci molekul ASK1 dochází prostřednictvím C-koncového „coiled-coil“ motivu [26]. V tomto komplexu je ASK1 udržována v neaktivní formě díky interakci s thioredoxinem (TRX), který intereaguje s ASK1-TBD a dále také díky interakci s proteinem 14-3-3 rozeznávajícím fosforylovaný serin v motivu lokalizovaném C-terminálně od kinasové domény. Za stresových podmínek thioredoxin a protein 14-3-3

disociují a umožňují interakci ASK1, přesněji řečeno její centrální regulační oblasti, s TRAF2 a TRAF6, které pravděpodobně způsobují homooligomerizaci N-koncové části ASK1 a indukují otevřenou konformaci ASK1-CRR [27, 28]. Následně dochází k aktivaci ASK1 díky autofosforylaci aktivační smyčky a umožnění asociace s „downstream“ MAP2K [19].

#### 1.2.2.1 Regulace prostřednictvím TRX1

Thioredoxiny jsou malé proteinové molekuly o velikosti zhruba 12 kDa, které jsou exprimovány napříč biologickými druhy [29]. Jedná se o skupinu dithiolových oxidoreduktas, které v buňce plní nejrůznější biologické funkce. Mezi tyto funkce se řadí redukce disulfidových vazeb, zásobování redoxních enzymů redukčními ekvivalenty nebo regulace transkripčních faktorů či proteinů ať už prostřednictvím přímé redukce -SH skupin cysteinů, nebo za využití jiných mechanismů [30, 31]. Redukovaný TRX1 tvoří stabilní komplexy s monomerní ASK1-TBD se stechiometrií 1:1 [32].



**Obrázek 1.8** Krystalová struktura lidského redukovaného TRX1. Sekundární struktury jsou barevně odlišeny – červeně jsou znázorněny  $\alpha$ -helixy, žlutě  $\beta$ -listy a zeleně smyčky. V PDB databázi je struktura k nalezení pod kódem 1ERT [33].

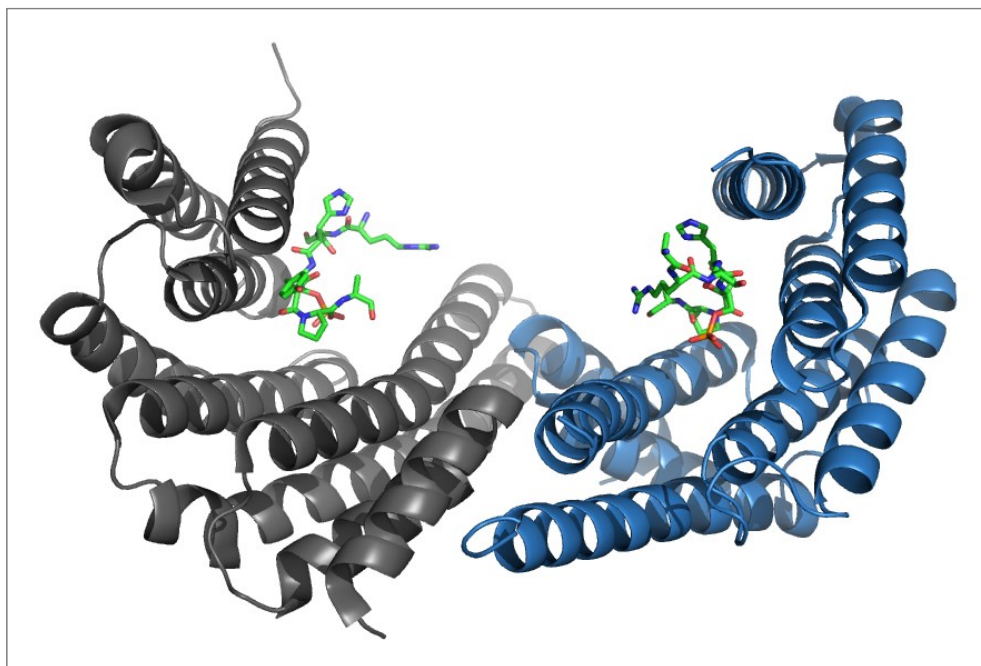
Savčí TRX1 obsahuje ve své sekvenci pět cysteinylových zbytků na pozicích 32, 35, 62, 69 a 73, z čehož dva cysteiny zodpovědné za oxidačně-redukční aktivitu TRX1 se nacházejí ve velmi konzervovaném katalytickém motivu W<sup>31</sup>CGPC<sup>35</sup>. Za oxidačních podmínek dochází mezi těmito dvěma cysteiny ke vzniku intramolekulární disulfidové vazby, což je jeden z hlavních faktorů podílejících se na disociaci TRX1 od ASK1-TBD a způsobující následnou aktivaci ASK1. Pro vznik vysokoafinitní vazby mezi TRX1 a ASK1-TBD za redukčních podmínek je z dvojice cysteinů C32, C35 zodpovědný cystein prvně jmenovaný. Kromě toho se na vazbě podílí také tryptofan 31 nacházející se v sekvenci hned vedle. Kromě vzniku intramolekulární disulfidové vazby mezi C32 a C35 dochází ke vzniku této vazby také mezi C62 a C69, avšak vznik této vazby nemá na disociaci komplexu TRX1:ASK1-TBD žádný vliv [34].

Co se týká samotné ASK1-TBD, v její sekvenci můžeme nalézt sedm zbytků cysteinu lišících se v přístupnosti rozpouštědлу. Bylo zjištěno, že jedině C250 je přístupný rozpouštědлу a zároveň nezbytný pro vazbu TRX1 za redukčních podmínek. Kromě C250 je v sekvenci ASK1-TBD důležitý také C200, který se účastní interakce s TRX1 přímo v jeho katalytickém místě. Za podmínek oxidačního stresu vznikají disulfidové vazby také u ASK1-TBD, čímž dochází ke změně struktury i v oblastech podílejících se na vazbě TRX1. Ke vzniku disulfidové vazby dochází konkrétně mezi C200-C206, C225-C226 a v malé míře také C185-C200 a C225/C226-C250, nicméně zatím není zřejmé, jaký dopad má vznik těchto vazeb na disociaci komplexu TRX1:ASK1-TBD [34].

### **1.2.2.2 Regulace prostřednictvím proteinu 14-3-3**

Proteiny 14-3-3 jsou dimerní proteiny specificky vázající jiné proteiny obsahující ve své sekvenci motiv s fosforylovaným serinem či threoninem. Rodina 14-3-3 proteinů se u savců skládá ze sedmi členů, jedná se o izoformy  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\sigma$ ,  $\zeta$ ,  $\tau$  a  $\eta$ , které shodně vykazují tzv. „horseshoe-like fold“. Jedná se o první rodinu proteinů, u nichž byly objeveny fosfoserin/fosfothreonin vazebné vlastnosti, a v následujících studiích byl postupně odhalován velký význam těchto proteinů v regulaci buněčné signalizace. Rodina proteinů 14-3-3 interaguje s celou řadou proteinů zahrnujících transkripční faktory, klíčové enzymy, cytoskeletální proteiny, signální molekuly, faktory apoptosy nebo nádorové supresory. Interakce proteinu 14-3-3 s cílovými proteiny může mít vliv na jejich umístění v rámci buňky, stabilitu, konformaci, fosforylační stav, aktivitu a další, což z nich činí zásadní

regulační článek v mnoha procesech, jejichž dysregulace často znamená rozvoj onemocnění [35]. Obzvláště důležitou roli mají tyto proteiny při regulaci buněčného cyklu a apoptosy [36].



**Obrázek 1.9** Krystalová struktura dimeru proteinu 14-3-3ζ. Ve stuhové reprezentaci jsou barevně odlišeny monomery složené shodně z devíti antiparalelních α helixů. V amfipatických žlábkách obou monomerů jsou znázorněny navázané fosfopeptidy. Struktura je v PDB databázi k nalezení pod kódem 1QJB [37].

Sekvence ASK1 C-terminálně od kinasové domény obsahuje vazebný motiv pro proteiny 14-3-3, rodinu dimerních proteinů rozeznávajících motivy obsahující fosforylované seriny či threoniny. V případě ASK1 se jedná o aminokyselinovou sekvenci RSIS<sup>966</sup>LP, která je konzervovaná napříč živočišnými druhy, a to navzdory tomu, že ostatní části C-koncové oblasti žádnou výraznější sekvenční podobnost nevykazují, což naznačuje důležitost tohoto motivu pro ASK1 [38]. K asociaci proteinů 14-3-3 se svými ligandy dochází v oblasti konzervovaného amfipatického žlábků [39].

Proteiny 14-3-3 fungují jako negativní regulátory proteinu ASK1. Při asociaci různých isoform proteinu 14-3-3 se svým vazebným motivem v proteinu ASK1 obsahujícím fosforin v pozici 966 dochází k potlačení pro-apoptotické funkce ASK1 a tím pádem potlačení buněčné smrti tímto proteinem vyvolané [40]. Za podmínek oxidačního stresu dochází kromě jiného k disociaci proteinu 14-3-3, což vede k aktivaci proteinkinasy ASK1. Bohužel,

molekulární mechanismus regulace ASK1 prostřednictvím proteinů 14-3-3 zůstává stále velmi nejasný [41]. Jedním z vysvětlení inhibičního vlivu proteinu 14-3-3 na aktivitu ASK1 je relokace ASK1 v reakci na jeho vazbu. Konkrétně dochází k přemístění ASK1 z cytoplasmatické oblasti do oblasti nalézající se blízko jádra, z experimentů vyplývá, že se jedná o oblast endoplasmatického retikula. Tato pozměněná intracelulární lokalizace ASK1 je v přímé spojitosti s vazbou 14-3-3 a v případě, kdy je vnesena mutace do 14-3-3 vazebného motivu v ASK1, nebo oblasti uvnitř 14-3-3 zodpovídající za vazbu ASK1, k této relokaci nedochází [40]. Vzhledem k blízkosti 14-3-3 vazebného motivu ke katalytické doméně je dále možné, že proteiny 14-3-3 svou vazbou na fosforylovaný serin 966 ovlivňují strukturu katalytické domény ASK1 nebo dostupnost aktivního místa pro její substráty a tím pádem ovlivňují aktivitu této proteinkinasy [41].

## **2. Cíl práce**

- Příprava plasmidu pro expresi proteinu ASK1-CRR-CD v bakteriích *Escherichia coli*.
- Optimalizace podmínek exprese proteinu ASK1-CRR-CD.
- Purifikace proteinu ASK1-CRR-CD.
- Biofyzikální a strukturní charakterizace proteinu ASK1-CRR-CD.

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Materiál

##### 3.1.1 Chemikálie a enzymy

1,4-dithiotreitol	Carl Roth, Německo
agarosa	Carl Roth, Německo
akrylamid	Carl Roth, Německo
ampicilin	Sigma, USA
APS	Sigma, USA
azid sodný	Sigma, USA
BamHI	New England Biolabs, USA
bis-akrylamid	Carl Roth, Německo
bromfenolová modř	Carl Roth, Německo
Coomassie Brilliant Blue R 250	Lachema, ČR
destilovaná voda vhodná pro PCR	Top-Bio, ČR
DNA oligonukleotidy	Sigma, USA
SDS	Sigma, USA
DpnI	New England Biolabs, USA
EDTA	Carl Roth, Německo
ethanol	Penta, ČR
ethanol pro UV spektroskopii	Penta, ČR
glycerol	Lachema, ČR
hexahydrát síranu nikelnatého	Penta, ČR
hydroxid sodný	Lach-Ner, ČR
chloramfenikol	Carl Roth, Německo
chlorid sodný	Carl Roth, Německo
imidazol	Carl Roth, Německo
IPTG	Sigma, USA
isopropanol	Lachema, ČR
kanamycin	Sigma, USA
kyselina chlorovodíková	Lachema, ČR



LB-agar	Carl Roth, Německo
LB-médium	Carl Roth, Německo
lysozym	Serva, Německo
methanol	Lachema, ČR
Midori Green Advance	Nippon Genetics, Německo
mix dNTP	Thermo Scientific, USA
NotI	New England Biolabs, USA
PMSF	Sigma, USA
polymerasa	New England Biolabs, USA
pufr 3.1	New England Biolabs, USA
pufr CutSmart	New England Biolabs, USA
T4 DNA ligasa	New England Biolabs, USA
TCEP	Thermo Scientific, USA
TEMED	Carl Roth, Německo
Tris	Carl Roth, Německo
XbaI	New England Biolabs, USA
β-merkaptoethanol	Sigma, USA

### 3.1.2 Další materiál

automatické pipety	Eppendorf, Německo
centrifugační kyvety	Carl Roth, Německo
dialyzační membrána, typ 27/32, cut-off 14kD	Carl Roth, Německo
DNA marker (Ladder 1 kb)	New England Biolabs, USA
DNA primery	Sigma, USA
<i>E. Coli</i> kmen BL21 (DE3)	Stratagene, USA
<i>E. Coli</i> kmen Rosetta (DE3)	Stratagene, USA
<i>E. Coli</i> kmen TOP10	Stratagene, USA
filtry SPARTAN 13/0,2 RC	GE Healthcare, USA
filtry SPARTAN 13/0,45 RC	GE Healthcare, USA
Gel Loading Solution (6 x)	Sigma, USA

GeneJET Gel Extraction Kit	Thermo Scientific, USA
GeneJET PCR Purification Kit	Thermo Scientific, USA
High-Speed Plasmid Mini Kit	Geneaid Biotech, Taiwan
horizontální elektroforéza	Thermo Scientific, USA
Chelating Sepharose Fast Flow	GE Healthcare, USA
kolona HiLoad Superdex 200 (26/60 GL)	GE Healthcare, USA
kolonka pro niklovou chelatační chromatografii	Bio-Rad Laboratories, USA
koncentrátory Amicon Ultra	EMD Millipore, USA
laboratorní sklo	Simax, ČR
mikrozkumavky	P-LAB, ČR
plazmid pRSFDuet-1	dar od Dr. Evžena Bouři, ÚOCHB, AV ČR v.v.i.
plazmid pST39	Novagen, USA
Precision Plus Protein Dual Color Standard	Bio-Rad Laboratories, USA
stříkačky	B. Braun, Německo
špičky na automatické pipety	Axygen, USA
vertikální elektroforéza	Bio-Rad Laboratories, USA

### 3.1.3 Přístroje

analytické váhy EG420-3NM	Kern, Německo
centrifuga 5804 R (rotor A-4-44)	Eppendorf, Německo
centrifuga HERMLE Z323K	Hermle, Německo
centrifuga SIGMA 8K (rotor 12510-H)	Sigma, USA
FPLC-AKTA	Amersham Biosciences, Švédsko
Implen NanoPhotometer P300	Implen, Německo
inkubátor HT Multitron	Infors, Švýcarsko
inkubátor Shaking Incubator NB-205	N-Biotek (Korea)
magnetická míchačka Variomag Maxi, Komet	Thermo Scientific, USA
peristaltická pumpa Ecoline	Ismatec, Německo
pH metr JENWAY 3305	P-Lab, ČR

ProteomLab <sup>TM</sup> XL-1 analytická ultracentrifuga	Beckman Coulter, USA
sonikátor 3000 Misonix	Misonix, USA
termoblok	Grant, UK
UV-VIS spektrofotometr Agilent 8453	Agilent Technologies, USA
vodní lázeň	Memmert, Německo
vortex Zx3	VELP Scientifica, Itálie
zdroj napětí pro elektroforézu	Bio-Rad Laboratories, USA

## 3.2 Příprava konstruktů pro expresi ASK1-CRR-CD

### 3.2.1 Sekvence ASK1

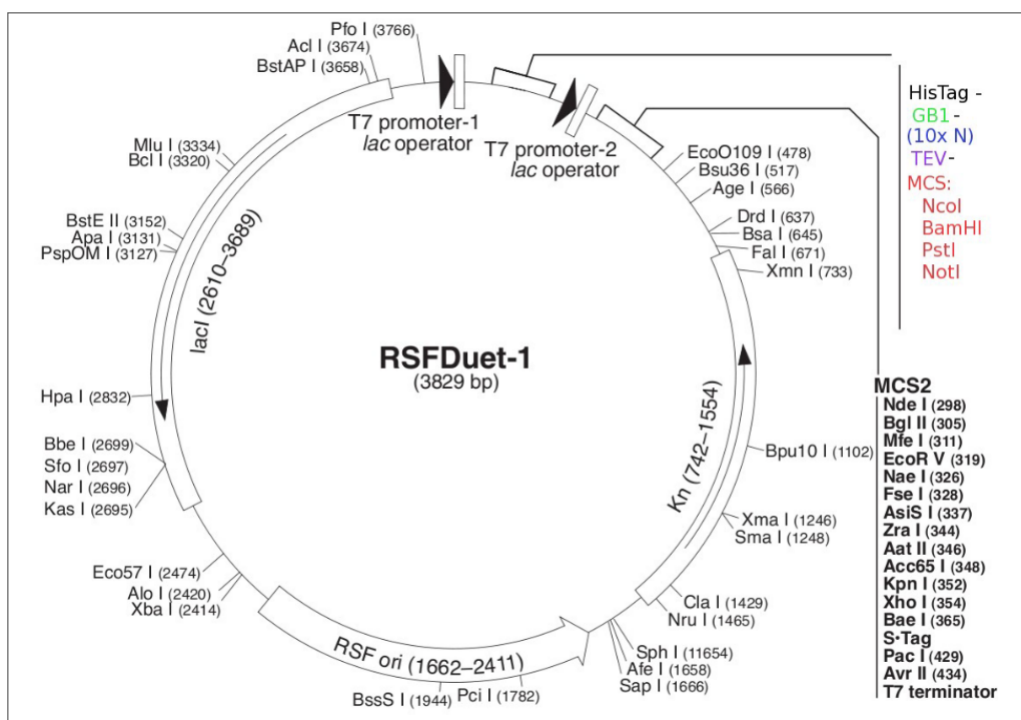
Jako výchozí sekvence pro přípravu expresního konstruktu ASK1-CRR-CD byla použita isoforma 1 lidské proteinkinasy ASK1 (celá sekvence je uvedena v příloze).

### 3.2.2 Expresní vektory

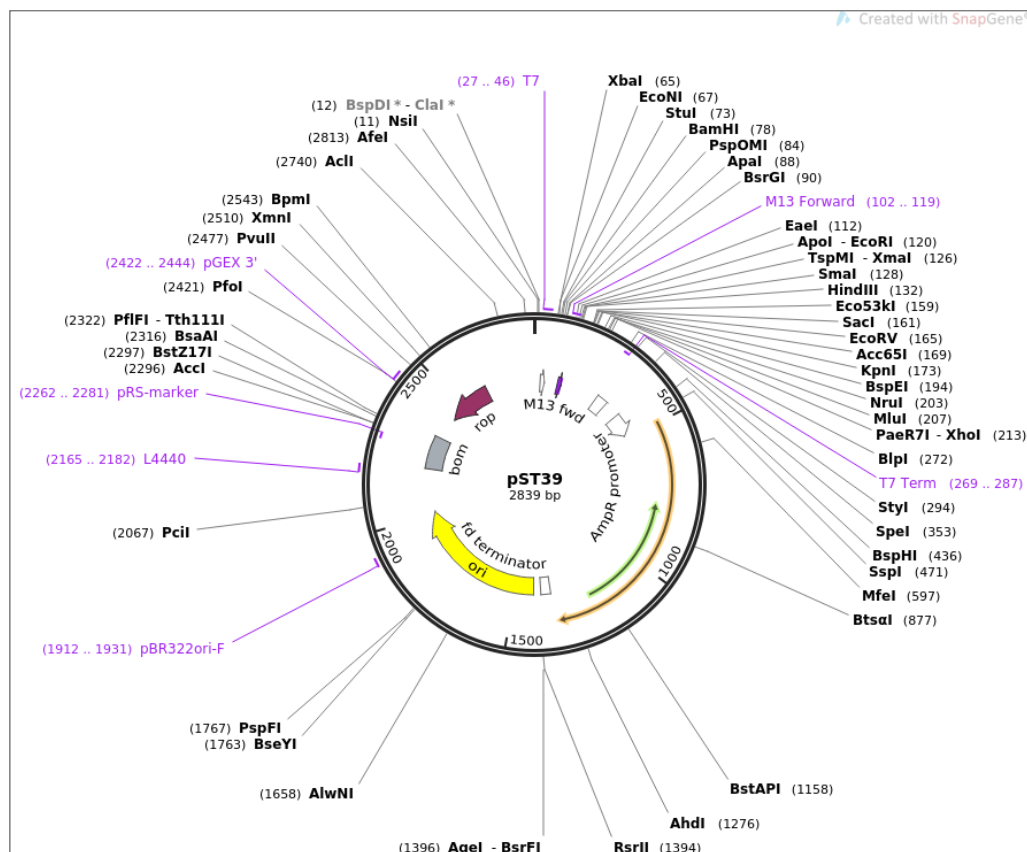
Pro expresi proteinů v bakteriálních buňkách jsou využívány plasmidy – malé kruhové dvouvláknové molekuly DNA, které se mohou replikovat nezávisle na chromosomální DNA. Plasmidy se nacházejí volně v cytoplazmě a často nesou doplňující geny, které mohou za určitých podmínek danému organismu poskytovat výhodu, či dokonce zajistit jeho přežití. Typickým příkladem genů poskytujících výhodu bakteriálním hostitelům jsou geny pro antibiotickou rezistenci. Velikost plasmidu se může pohybovat od 1 do 200 kbp (z anglického „kilo base pair“) a množství konkrétního plasmidu uvnitř jedné buňky, definované jako tzv. „copy number“ plasmidu, může za určitých okolností dosáhnout až počtu několika tisíc. Plasmidy jsou často využívány jako expresní vektory pro produkci rekombinantních proteinů v bakteriálních systémech, přičemž pro jejich vnesení do bakteriálních buněk se využívá transformace – metody horizontálního přenosu genetické informace.

Sekvence proteinu ASK1 v rozsahu aminokyselin 88-973 byla vložena do plasmidů pRSFDuet-1 a pST39. pRSFDuet-1 (mapa plasmidu na obrázku 3.1, str. 28) je plasmid o velikosti 3 829 bp obsahující dvě místa pro vnesení genu pod kontrolou T7 promotoru. Sekvence ASK1 byla vložena do prvního místa, které obsahuje histidinovou kotvu využívanou při purifikaci proteinu pomocí chelatační afinitní chromatografie, dále fúzní protein GB1 zlepšující rozpustnost připravovaného proteinu, dále tzv. poly-N linker (deset zbytků

aminokyseliny asparaginu), štěpné místo pro TEV proteasu (TEV – z anglického „tobacco etch virus“) umožňující odštěpení histidinové kotvy, čtyři restrikční místa pro enzymy NcoI, BamHI, PstI a NotI umožňující vložení exprimovaného genu do plasmidu a nakonec také gen zajišťující antibiotickou rezistenci, v tomto případě rezistenci ke kanamycinu. pST39 (mapa plasmidu na obrázku 3.2, str. 29) je plasmid o velikosti 2 839 párů basí, jehož součástí je rovněž T7 promotor. Kromě toho se zde nachází neodštěpitelná histidinová kotva na C-konci a opět gen zajišťující hostitelskému organismu antibiotickou rezistenci, v tomto případě rezistenci k ampicilinu.



**Obrázek 3.1** Mapa upraveného plasmidu *pRSFDuet-1*. Plasmid zahrnuje dvě místa pro vložení exprimovaného genu, přičemž první z nich obsahuje N-terminální histidinovou kotvu, protein GB1, „poly-N linker“ složený z 10 za sebou následujících zbytků aminokyseliny asparaginu a také štěpné místo pro TEV proteasu.



Obrázek 3.2 Mapa plasmidu pST39

### 3.2.3 Amplifikace genu ASK1-CRR-CD

Před vložením požadovaného genu do expresního vektoru je nejprve nutné provést amplifikaci vkládané DNA, která se provádí za využití polymerázové řetězové reakce (PCR - z anglického „polymerase chain reaction“) umožňující produkci velkého množství DNA z malého množství původního materiálu. Oblast DNA, kterou je třeba amplifikovat, je ohraničena oligonukleotidy, jejichž velikost se může lišit, ale obvykle se pohybuje v rozmezí 15-30 nukleotidů. Tyto oligonukleotidy jsou komplementární ke koncům amplifikované oblasti DNA, díky tomu zde nasedají a následně v těchto místech může započít syntéza DNA ve směru 5' → 3'. Aby mohla celá reakce probíhat, musí reakční směs obsahovat všechny nezbytné komponenty, kterými je kromě již zmíněných oligonukleotidů také DNA polymerasa, templátová DNA sloužící jako předloha pro syntézu nově vznikajícího vlákna, deoxyribonukleosidtrifosfáty (dNTP) – dATP (deoxyadenosintrifosfát), dCTP (deoxycytosintrifosfát), dGTP (deoxyguanosintrifosfát) a dTTP (deoxythymidintrifosfát) – stavební

jednotky nově vznikající DNA, a kromě toho také vhodný reakční pufr zajišťující optimální podmínky pro činnost DNA polymerasy.

Amplifikace se odehrává v opakovaných cyklech, které se skládají ze tří definovaných kroků – denaturace, nasedání oligonukleotidů a polymerace. V prvním kroku je templátová DNA zahřívána po dobu asi 30 sekund na teplotu okolo 95°C, což vede k rozrušení vodíkových můstků ve dvouřetězcové molekule DNA a oddělení obou vláken. V dalším kroku, který probíhá při teplotě v rozmezí 50-65°C po dobu zhruba jedné minuty, se oligonukleotidy váží na komplementární sekvence koncových oblastí cílového genu a tím umožňují provedení dalšího kroku, kterým je samotná polymerace. Tento krok probíhá obvykle při teplotě 72°C, přičemž doba, po kterou polymerace probíhá, se odvíjí od velikosti amplifikovaného úseku DNA. Dochází zde k připojování deoxynukleosidtrifosfátů činností DNA polymerasy ve směru 5' → 3', tedy k samotné syntéze DNA, při které vzniká nové vlákno komplementární k původní molekule. Sled těchto kroků se cyklicky opakuje, obvykle je pro dostatečnou amplifikaci postačujících 30 cyklů. Celá reakce probíhá ve speciálním zařízení umožňujícím skokové změny teplot – tzv. termocykleru.

Pro amplifikaci cDNA ASK1 (269-973) byly navrženy dva páry oligonukleotidů – tzv. přímý a zpětný oligonukleotid. Jeden pár byl určen pro plasmid pRSFDuet-1 a druhý pro plasmid pST39. Oligonukleotidy byly navrženy tak, aby obsahovaly kromě částí komplementárních ke konci amplifikovaného genu rovněž štěpná místa pro restriční endonukleasy, přičemž různé restriční endonukleasy vyžadují pro svou funkci různě dlouhé přesahy, což bylo při návrhu oligonukleotidů také zohledněno. V případě plasmidu pRSFDuet-1 bylo do přímého oligonukleotidu vneseno restriční místo pro endonukleasu BamHI a do zpětného oligonukleotidu restriční místo pro endonukleasu NotI. Pro plasmid pST39 bylo do přímého oligonukleotidu vneseno restriční místo pro endonukleasu XbaI a do zpětného oligonukleotidu bylo vneseno restriční místo pro BamHI. Sekvence oligonukleotidů navržených pro oba plasmidy jsou uvedeny v obrázku 3.3 (str. 31).

**ASK1-pRSFDuet-1-přímý**

5' - GCC ATG GGA TCC AGC CAG TAC TTC CGG GAA TCT ATA CTC AAT G - 3'

**ASK1-pST39-přímý**

5' - C TAG TCT AGA AAT AAT TTT GTT TAA CTT TAA GAA GGA GAT ATA CAT  
ATG AGC CAG TAC TTC CGG GAA TCT ATA CTC - 3'

**ASK1-pRSFDuet-1-zpětný**

5' - CGT CGT CCT TGG CGG CCG CCT ACA CCA GCA CAG GTA CCG GCA AGG - 3'

**ASK1-pST39-zpětný**

5' - CTG CGG ATC CCT AGT GGT GAT GAT GGT GAT GGC TGC TGT TCA CCA GCA  
CAG GTA CCG GCA AGG - 3'

**Obrázek 3.3** Sekvence oligonukleotidů navržených pro přípravu konstruktů ASK1 (269-973) do expresních vektorů pRSFDuet-1 a pST39. Část odpovídající sekvenci ASK1 je znázorněna podtrženě, zásahová místa restričních endonukleas jsou zobrazena v barevném rámečku – BamHI zeleně, XbaI oranžově a NotI modře.

Oligonukleotidy byly zakoupeny od firmy Sigma-Aldrich v lyofilizované podobě a byly připraveny k použití dle pokynů výrobce, tzn. byly rozpuštěny v určeném množství deionizované vody, čímž vznikl 100  $\mu\text{M}$  zásobní roztok daného oligonukleotidu, který byl následně 10x zředěn na pracovní koncentraci 10  $\mu\text{M}$ . Takto připravené oligonukleotidy již byly použity pro přípravu reakční PCR směsi, jejíž složení je uvedeno v tabulce 3.1 a přesné parametry jsou popsány v tabulce 3.2 (str. 32).

**Tabulka 3.1** Složení reakcí PCR.

ASK1 (269-973) v pRSFDuet-1		ASK1 (269-973) v pST39	
	V [ $\mu$ ]		V [ $\mu$ ]
dH <sub>2</sub> O	31	dH <sub>2</sub> O	31
„Phusion reaction buffer“ 5x	10	„Phusion reaction buffer“ 5x	10
10 mM dNTPs	1	10 mM dNTPs	1
10 $\mu\text{M}$ přímý oligonukleotid (BamHI)	2,5	10 $\mu\text{M}$ přímý oligonukleotid (XbaI)	2,5
10 $\mu\text{M}$ zpětný oligonukleotid (NotI)	2,5	10 $\mu\text{M}$ zpětný oligonukleotid (BamHI)	2,5
ASK1 cDNA	2	ASK1 cDNA	2
Phusion DNA polymerasa	1	Phusion DNA polymerasa	1

**Tabulka 3.2 Parametry provedených reakcí PCR.**

ASK1-269-973 v pRSFDuet-1/pST39			
	Počáteční denaturace	95 °C	2 min
30 x	Denaturace	95 °C	30 sec
	Navázání oligonukleotidů	50 °C	1 min
	Polymerace	72 °C	3,5 min
	Dokončení polymerace	72 °C	10 min
	Udržování	4 °C	

Po proběhnutí reakce PCR byly z každé reakční směsi odebrány 3 µl, které byly použity pro kontrolu čistoty na agarosové elektroforéze. Produkty odpovídající konstruktům ASK1 (269-973) byly čisté, proto nebylo nutné výsledný produkt vyřezávat z gelu, ale bylo rovnou přistoupeno k čištění produktů pomocí „GeneElute PCR Clean-up“ kitu, který slouží k odstranění reakčních složek, jakými jsou přebytečné oligonukleotidy, deoxynukleosid-trifosfáty či DNA polymerasa. Při čištění PCR produktů byly dodržovány pokyny výrobce a všechny centrifugace dále zmíněné probíhaly při 12 100 g.

K objemu reakční směsi PCR bylo přidáno 5 objemů vazebného roztoku, tato směs byla přenesena do vazebné kolonky a centrifugována po dobu 1 minuty. Filtrát byl odstraněn. Poté bylo do kolonky k navázané DNA přidáno 0,5 ml promývacího roztoku a opět centrifugováno 1 minutu. Filtrát byl opět odstraněn a kolonka byla bez přidávání jakékoliv dalšího roztoku ještě jednou centrifugována po dobu 2 minut, abychom se zbavili přebytečného promývacího pufru. Po tomto kroku byla kolonka s navázanou DNA přemístěna do nové sterilní zkumavky, bylo přidáno 40 µl deionizované vody zahřáté na 60°C, se kterou byla navázaná DNA inkubována po dobu 1 minuty a následně proběhla finální centrifugace trvající 2 minuty, čímž bylo dosaženo eluce DNA. Tento postup byl proveden u obou PCR produktů.

### **3.2.4 Štěpení PCR produktů a expresních vektorů restrikčními enzymy**

Před vložením genu do plasmidu je nejprve nezbytné kruhovou molekulu plasmidu rozštěpit a dále zajistit, aby byly sekvence plasmidu a genu na svých koncích komplementární a v následném ligačním kroku tak bylo možné tyto dvě molekuly spojit kovalentní vazbou. K tomu se využívají restrikční endonukleasy, které specificky štěpí sekvenci DNA plasmidu/genu v příslušném místě.



Při přípravě konstruktu ASK1 (269-973) v plasmidu pRSFDuet-1 byly plasmid i cDNA ASK1 štěpeny restričními endonukleasami BamHI a NotI v prostředí pufru 3.1 (New England Biolabs, tabulka 3.3) a při přípravě identického konstruktu v plasmidu pST39 byly použity restriční endonukleasy XbaI a BamHI v prostředí pufru CutSmart (New England Biolabs, tabulka 3.4). Štěpení restričními endonukleasami probíhalo při teplotě 37 °C, v případě plasmidů po dobu 3,5 hodiny a v případě inzertů po dobu 2 hodin.

**Tabulka 3.3 Příprava reakční směsi pro štěpení plasmidů pRSFDuet-1 a ASK1.**

	<b>pRSFDuet-1</b>	<b>inzert</b>
dd H <sub>2</sub> O	30 µl	8 µl
pufr „3.1“ (10x)	5 µl	6 µl
BamHI	2,5 µl	3 µl
NotI	2,5 µl	3 µl
DNA	10 µl	40 µl

**Tabulka 3.4 Příprava reakční směsi pro štěpení plasmidu pST39 a ASK1.**

	<b>pST39</b>	<b>inzert</b>
dd H <sub>2</sub> O	-	8 µl
pufr „CutSmart“ (10x)	5 µl	6 µl
XbaI	2,5 µl	3 µl
BamHI	2,5 µl	3 µl
DNA	40 µl	40 µl

### 3.2.5 Elektroforéza

Elektroforéza je metoda využívaná pro separaci různě dlouhých fragmentů nukleových kyselin. Nukleové kyseliny jsou v důsledku přítomnosti fosfátových skupin záporně nabitě, a proto v elektrickém poli putují ke kladné elektrodě. Rychlost, jakou se nukleové kyseliny pohybují, závisí na jejich délce a konformaci. Pro dělení fragmentů o délce v rozmezí 100 bp až 50 kbp se využívá agarosových gelů, přičemž podle velikosti separovaných fragmentů se využívá různý procentní obsah agarosy – lineárního polysacharidu složeného z opakujících se jednotek disacharidu skládajícího se z D-galaktosy a 3,6-anhydro-L-galaktopyranosy, který je extrahován z červených řas.

Pro elektroforézu byl připraven agarosový gel s 0,8% obsahem agarosy. Bylo naváženo 0,36 g agarosy, které bylo smícháno se 45 ml 1x koncentrovaného TAE (Tris/acetát/EDTA) pufru. Tato směs byla zahřáta v mikrovlnné troubě tak, aby došlo k úplnému

rozpuštění agarosy a vzniku čirého roztoku. Po mírném zchlazení bylo do této směsi přidáno 2,25 µl fluorescenčního barviva MidoriGreen využívaného pro vizualizaci separace DNA, protože barvivo navázané na DNA pod UV zářením fluoreskuje. Takto připravená směs byla nalita do vaničky určené pro přípravu elektroforetických gelů. Po ztuhnutí byl gel přemístěn do elektroforetické aparatury a byl přelit 1x TAE pufrem. Na gel byly naneseny vzorky smíchané s odpovídajícím množstvím 6x koncentrované nanášecí barvy obsahující bromfenolovou modř a xylencyanol migrující přibližně jako fragmenty o velikosti 3 000 a 300 bp, díky jejichž přítomnosti bylo možné sledovat rychlost migrace. Jako standard byla použita komerčně dostupná směs DNA fragmentů o velikostech 500 bp – 10 kbp (1kb DNA ladder - Sigma). Elektroforéza pro kontrolu čistoty inzertů probíhala 50 minut při napětí 90 V, elektroforéza pro separaci různých konformačních stavů plasmidových DNA trvala 70 minut při napětí 80 V. Výsledná separace byla vizualizována na transiluminátoru.

### **3.2.6 Extrakce DNA z agarosového gelu**

Plasmidová DNA se může vyskytovat ve třech konformacích – relaxované cirkulární, která putuje gelem nejpomaleji, lineární a superspiralizované formě. Pro ligaci cílového genu do plasmidu je třeba získat dvojité štěpený plasmid, tzn. plasmid v lineární konformaci.

Migrační zóny odpovídající dvojité štěpeným plasmidům byly vyříznuty z gelu a plasmidová DNA byla následně izolována pomocí extrakčního kitu „GenElute™ Gel Extraction Kit“. Bylo postupováno podle návodu extrakčního kitu a veškeré zmíněné centrifugace probíhaly při 12 100 g.

Vyříznutý DNA fragment byl zvážen a následně k němu bylo přidáno trojnásobné množství solubilizačního roztoku. Tato směs byla inkubována po dobu zhruba 10 minut při teplotě 60°C a během tohoto procesu byla několikrát promíchána, aby se gel snadněji rozpustil. Během solubilizace agarosového gelu byla připravena vazebná kolonka - byla umístěna do 2 ml sběrné kolonky, bylo přidáno 0,5 ml ekvilibračního roztoku a následně proběhla 1-minutová centrifugace. Filtrát byl odstraněn. Po rozpuštění gelu byl ke směsi přidán jeden objem gelu 100 % isopropanolu a směs byla míchána do homogenity. Získaný roztok byl aplikován na předem ekvilibrovanou vazebnou kolonku umístěnou ve 2 ml sběrné kolonce a proběhla 1-minutová centrifugace. Filtrát byl odstraněn a v dalším kroku bylo na kolonku aplikováno 0,7 ml promývacího roztoku. Následovala 1-minutová centrifugace, filtrát byl odstraněn. Kolonka byla umístěna zpět do sběrné zkumavky a bez přidávání

jakéhokoliv dalšího roztoku byl zopakován centrifugační krok, aby bylo zajištěno odstranění zbytkového promývacího pufru. Poté byla kolonka s navázanou plasmidovou DNA přemís-  
těna do nové sterilní zkumavky a do středu membrány vazebné kolonky bylo přidáno 50 µl  
deionizované vody předeřáté na 60 °C, se kterou byla navázaná DNA 2 minuty inkubována.  
DNA byla uvolněna z vazebné kolonky při finální 1-minutové centrifugaci.

### 3.2.7 Ligace ASK1 (269-973) do pRSFDuet-1/pST39

Vložení cílového genu do expresního vektoru je zajištěno procesem zvaným ligace. Při tomto procesu dochází ke spojení volných konců inzertů a vektoru prostřednictvím enzymu DNA ligasy. V praxi se nejčastěji využívá T4 DNA ligasy, která dokáže spojovat jak kohezní, tak tupé konce.

Ligační reakce obsahovala expresní vektory a inzerty štěpené příslušnými restrikčními endonukleasami, dále ligační pufr obsahující ATP a nezbytné soli zajišťující optimální podmínky pro činnost DNA ligasy a nakonec T4 DNA ligasu. Přesné objemy reakčních složek jsou uvedeny v tabulce 3.5. Ligační reakce probíhala 2 hodiny při teplotě 18 °C.

*Tabulka 3.5 Složení ligační reakce*

	<b>pRSFDuet-1</b>	<b>pST39</b>
dd H <sub>2</sub> O	5,75 µl	5,4 µl
pufr 10 x	1 µl	1 µl
vektor	1,5 µl	1,5 µl
cílový gen	0,75 µl	1,1 µl
T4 DNA ligasa	1 µl	1 µl

### 3.2.8 Transformace

Pro integraci připraveného plasmidu do bakteriálních buněk se využívá techniky horizontálního přenosu genetické informace – tzv. transformace. Předpokladem pro úspěšnou transformaci bakteriálních buněk je jejich schopnost přijmout z okolního prostředí cizorodou DNA. Této schopnosti se říká kompetence a je možné ji vytvořit buď chemickou cestou nebo tzv. elektroporací. V obou případech se jedná o narušení buněčné stěny a její zprůchodnění pro vkládanou DNA.

Kompetentní buňky *E.Coli* TOP10 skladované při teplotě  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  připravené chemickou cestou (za využití chloridu rubidného) byly rozmrazeny na ledu a k  $30\text{ }\mu\text{l}$  těchto buněk byly přidány  $3\text{ }\mu\text{l}$  ligační směsi. Roztok s buňkami byl jemně promíchán a byl inkubován 30 minut na ledu. Poté byl proveden teplotní šok – směs byla na 45 sekund přemístěna do vodní lázně předehřáté na teplotu  $42\text{ }^{\circ}\text{C}$  – zajišťující prostupnost cytoplazmatické membrány a „vtažení“ plasmidové DNA do buněk. Poté byla směs na 2 minuty přemístěna na led, bylo přidáno  $300\text{ }\mu\text{l}$  LB (Luria-Bertani) média předehřátého na teplotu  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a směs byla 1 hodinu inkubována při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a intenzivním třepání. Po hodinové inkubaci celý objem roztoku s buňkami nanesen na agarové misky obsahující příslušné antibiotikum (kanamycin pro ASK1 (269-973) v pRSFDuet-1, ampicilin pro ASK1 (269-973) v pST39). Misky s buňkami byly inkubovány dnem vzhůru přes noc při teplotě  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  a následující den byly s narostlými bakteriemi uloženy do  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2.9 PCR z bakteriálních kolonií

Antibiotikum v pevném kultivačním médiu zajistí, že na miskách narostou pouze kolonie bakterií, které přijaly plasmid poskytující bakteriím rezistenci na příslušné antibiotikum. Bakterie ale mohou přijmout i prázdný plasmid. Z toho důvodu je nutné dále selektovat pouze bakterie obsahující plasmid s úspěšně vloženým genem. K tomuto účelu se využívá PCR z bakteriálních kolonií.

Byly připraveny PCR reakční směsi o finálním objemu  $20\text{ }\mu\text{l}$  (tabulka 3.6, str. 37), jejichž součástí byly oligonukleotidy specifické pro vkládaný úsek DNA. Jako templátové DNA byly použity kolonie narostlé na agarových miskách, jejichž část byla špičkou vložena do reakční směsi PCR. Špičky byly uschovány ve sterilních zkumavkách při  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  pro pozdější použití při zakládání buněčných kultur. Parametry použitého programu PCR jsou uvedeny v tabulce 3.7 na straně 37.

**Tabulka 3.6 Příprava reakce PCR z bakteriálních kolonií.**

	<b>pRSFDuet-1</b>		<b>pST39</b>
dd H <sub>2</sub> O	12 µl	dd H <sub>2</sub> O	12 µl
„Phusion pufr“ 5x	4 µl	„Phusion pufr“ 5x	4 µl
10 mM dNTP	1 µl	dNTP	1 µl
10µM přímý oligonukleotid (GB1)	1 µl	10µM přímý oligonukleotid (T7 promotor)	1 µl
10 µM zpětný oligonukleotid (T7 terminator)	1 µl	10 µM zpětný oligonukleotid (T7 terminator)	1 µl
Phusion polymerasa	1 µl	Phusion polymerasa	1 µl

**Tabulka 3.7 Parametry PCR reakce z bakteriálních kolonií.**

<b>ASK1-269-973 v pRSFDuet-1/pST39</b>			
	<b>Krok</b>	<b>Teplota</b>	<b>Trvání</b>
	Počáteční denaturace	95 °C	5 min
30 x	Denaturace	95 °C	30 sec
	Nasednutí primerů	55 °C	30 sec
	Polymerace	72 °C	4 min
	Dokončení polymerace	72 °C	10 min
	Udržování	4 °C	

Přítomnost vneseného genu v plasmidu byla zkontrolována pomocí agarosové elektroforézy. Objem nanášených vzorků již smíchaných s 6x koncentrovaným nanášecím barvivem byl 5 µl a jako standard byla použita komerčně dostupná směs DNA fragmentů o délce 500 bp - 10 kbp (1 kb DNA ladder – Sigma).

### 3.2.10 Kultivace bakterií a izolace plasmidové DNA

Kolonie, které byly pozitivní na přítomnost vloženého genu, byly použity pro založení bakteriálních kultur v 5 ml LB média obsahujícím příslušná antibiotika (kanamycin o výsledné koncentraci 30 µg/ml, ampicilin o výsledné koncentraci 100 µg/ml). Uschované špičky použité při PCR z bakteriálních kolonií se zachycenými bakteriemi byly vloženy do připravených objemů LB médií, která byla inkubována přes noc při 37 °C a 200 RPM. Následující den byla z narostlých bakteriálních kultur izolována plasmidová DNA za využití kitu „High-Speed Plasmid Mini Kit“ a bylo postupováno podle přiloženého protokolu. Všechny centrifugace probíhaly 12 100 g.

Bakteriální kultura byla po 1-minutových intervalech centrifugována. Získaná peleta byla resuspendována s 200 µl roztoku PD1. Poté bylo přidáno 200 µl roztoku PD2, směs byla zamíchána a ponechána inkubovat po dobu 3 minut, což mělo zajistit lyzi buněk. Následně bylo přidáno 300 µl roztoku PD3, směs byla opět zamíchána a centrifugována po dobu 3 minut. Do připravené vazebné kolonky umístěné ve 2 ml sběrné zkumavce byl přemístěn získaný supernatant a proběhla další centrifugace trvající 30 sekund, která by měla zajistit navázání DNA na kolonku. Filtrát byl odstraněn ze sběrné zkumavky a kolonka byla umístěna zpět. V následujícím kroku bylo do kolonky přidáno 400 µl roztoku W1, kolonka byla centrifugována 30 sekund a filtrát byl opět odstraněn. Poté bylo přidáno 600 µl promývacího roztoku a kolonka byla centrifugována 30 sekund. Filtrát byl odstraněn a centrifugační krok byl ještě jednou zopakován bez přidávání jakéhokoliv dalšího roztoku, abychom se zbavili přebytečného promývacího roztoku. Nakonec byla vazebná kolonka umístěna do nové sterilní zkumavky, do středu membrány vazebné kolonky bylo přidáno 40 µl sterilní deionizované vody, se kterou proběhla 2-minutová inkubace při pokojové teplotě a na závěr byla navázaná DNA uvolněna při finální 2-minutové centrifugaci.

Správnost sekvence izolované DNA byla ověřena sekvenací, která byla provedena firmou Eurofins Genomics.

### 3.2.11 PCR vnášející mutaci

Pro vnášení změn (substitucí, inzercí či delecí) do sekvence DNA je možné využít metody PCR. Princip spočívá v navržení oligonukleotidů, které ve své sekvenci obsahují požadovanou změnu. Při PCR následně dochází k amplifikaci DNA s mutací předem specifikovanou sekvencí použitých oligonukleotidů. Pro mutagenezní PCR byly navrženy oligonukleotidy znázorněné na obrázku 3.4, ve kterých byl serin v pozici 942 nahrazen stop kodonem.

**Přímý oligonukleotid vnášející mutaci S942stop**

5' - GAT GAG TTT TTA AAA GTT TCA **TGA** AAA AAG AAA AAG ACA CAA CC – 3'

**Zpětný oligonukleotid vnášející mutaci S942stop**

5' - GGT TGT GTC TTT TTC TTT TTT **CAT** GAA ACT TTT AAA AAC TCA TC – 3'

*Obrázek 3.4 Navržené oligonukleotidy pro vnesení mutace S942stop. Trojice basí v červených rámečcích představují již pozměněnou sekvenci kódující stop kodon.*

Byly připraveny reakční směsi, při jejichž přípravě byl nejprve namíchán tzv. „master-mix“ – tzn. roztok obsahující deionizovanou vodu, 5x koncentrovaný reakční pufr, deoxynukleosidtrifosfáty, navržené oligonukleotidy a DNA polymerasu. K této směsi byla nakonec přidána příslušná templátová DNA. Složení reakce a objemy jednotlivých složek jsou uvedeny v tabulce 3.8.

*Tabulka 3.8 Složení reakce pro PCR vnášející mutaci.*

	V [μl]
dd H <sub>2</sub> O	33
Phusion pufr 5 x	10
dNTP	1
přímý oligonukleotid	2
zpětný oligonukleotid	2
Phusion polymerasa	1
DNA	1

PCR bylo prováděno v termocykleru TProfessional (Analytik Jena) a parametry použitého programu jsou uvedeny v tabulce 3.9 (str.40).

**Tabulka 3.9 Parametry PCR vnášející mutaci.**

<b>ASK1(269-973) S942stop v pRSFDuet-1/pST39</b>			
	Počáteční denaturace	95 °C	2 min
30 x	Denaturace	95 °C	30 sec
	Navázání oligonukleotidů	50 °C	1 min
	Polymerace	72 °C	7 min
	Dokončení polymerace	72 °C	10 min
	Udržování	4 °C	

Po dokončení PCR bylo k celému objemu směsi přidáno 1,5 µl enzymu DpnI, se kterým byla směs inkubována 2 hodiny při teplotě 37 °C. Restrikční enzym DpnI je do reakce přidáván z toho důvodu, že umožňuje selektivně odstranit původní templátovou DNA, která je methylována, zatímco nově vzniklá DNA methylovaná není. Tímto způsobem získanou DNA byly následně transformovány bakterie (již popsáno v kapitole 3.2.8), z bakteriálních kolonií na agarovém médiu byly přeneseny kolonie, napěstovány bakteriální kultury a z nich izolována plasmidová DNA. Přítomnost mutace a správnost DNA byla zkontrolována sekvenací.

### **3.3 Optimalizace exprese konstruktů ASK1-CRR-CD**

#### **3.3.1 Transformace do *E. Coli* BL21 (DE3)**

Připravený konstrukt ASK1-CRR-CD v plasmidech pRSFDuet-1 a pST39 byl použit pro transformaci bakteriálních buněk *E. Coli* BL21 (DE3). Transformace proběhla podobným způsobem, jako je popsáno v kapitole 3.2.8, tzn. 40 µl buněk *E. Coli* BL21 (DE3) bylo smícháno se 4 µl DNA, směs byla inkubována 30 minut na ledu, poté byla na 45 sekund přesunuta do vodní lázně předehřáté na 42 °C a následně na 2 minuty zpět na led. Po 2 minutách bylo ke směsi přidáno 400 µl LB média předehřátého na teplotu 37 °C a směs byla inkubována 1 hodinu při 37 °C (200 RPM). Po uplynutí této doby bylo 100 µl směsi naneseno u agarové misky s příslušným antibiotikem, které byly přes noc inkubovány při teplotě 37 °C dnem vzhůru.



### **3.3.2 Kultivace bakterií a příprava zásobních glycerolových stoků**

Z bakteriálních kolonií byly připraveny bakteriální kultury – k 5 ml sterilního LB média bylo přidáno 5  $\mu$ l příslušného antibiotika a dále vložena špička s bakteriální kolonií. Bakteriální kultury byly inkubovány přes noc při 37 °C (200 RPM).

Glycerolové stoky byly připraveny tak, že bakteriální kultury byly krátce promíchány, bylo odebráno 700  $\mu$ l, které byly smíchány s 300  $\mu$ l sterilního glycerolu. Tato směs byla zamražena na -80 °C a dále sloužila jako zásobní roztok.

### **3.3.3 Optimalizace exprese ASK1-CRR-CD**

Purifikaci proteinu ASK1-CRR-CD z většího množství bakteriální kultury předcházely expresní testy, které měly za cíl zjistit, jaké podmínky zajistí co nejlepší expresi připravovaného proteinu. Při optimalizaci expresních podmínek se dají uplatnit různé strategie pro zvýšení výtěžku proteinu. Zvýšení exprese v bakteriálním systému je možné zajistit volbou bakteriálních kmenů, expresních vektorů, fúzních proteinů, délkou indukce, koncentrací indukčního činidla, teplotou inkubace nebo volbou kultivačního média.

Při optimalizaci exprese proteinu ASK1-CRR-CD byly provedeny expresní testy z 1 litru bakteriální kultury, při kterých byly vyzkoušeny 2 různé expresní vektory (pRSFDuet-1 a pST39), různé teploty při expresi proteinu (25 °C, 20 °C, 18 °C) a také různá kultivační média (klasické LB médium a také nutričně bohatší TB médium – z anglického „terrific broth“). Na základě provedených expresních testů byla vybrána kombinace podmínek vedoucí k nejlepší pozorované expresi, která byla následně použita pro přípravu proteinu z většího objemu bakteriální kultury.

## **3.4 Exprese a purifikace proteinu ASK1-CRR-KD v pRSFDuet-1**

### **3.4.1 Kultivace bakterií**

Do 5 ml sterilního LB média bylo přidáno 5  $\mu$ l kanamycinu o koncentraci 30 mg/ml pro dosažení finální koncentrace 30  $\mu$ g/ml. Dále bylo přidáno 5  $\mu$ l bakteriální kultury z glycerolového zásobního roztoku ASK1-CRR-CD ve vektoru pRSFDuet-1, *E.Coli* BL21 (DE3) a tato kultura byla inkubována přes noc při teplotě 37 °C (200 RPM).

Získané bakteriální kultury byly použity jako startovací kultury pro kultivaci ve větším objemu. Do 900 ml LB média byl přidáno 900  $\mu$ l kanamycinu (finální koncentrace 30  $\mu$ g/ml) a 5 ml „noční“ kultury. Čerstvá kultura byla kultivována při 37 °C a 200 RPM až do hodnoty optické denzity při 600 nm  $\sim$  0,7 až 0,8. V tomto okamžiku byla bakteriální kultura vyjmuta z inkubátoru a na 1 hodinu přesunuta do chladné místnosti. Teplota v inkubátoru byla mezitím snížena na 18 °C a po 1 hodině byla indukována exprese ASK1-CRR-CD přidáním indukčního činidla isopropyl  $\beta$ -D-1-thiogalaktopyranosidu (IPTG) do finální koncentrace 0,5 mM a kultura byla při 18 °C kultivována přes noc (přibližně 18 hodin).

### 3.4.2 Centrifugace a resuspendace bakteriální kultury

Připravené bakteriální kultury byly centrifugovány na centrifuze Sigma 8K po dobu 20 minut při 2 073 g. Po centrifugaci buněk byl supernatant odstraněn a dále se pracovalo se získanou bakteriální peletou. Bakteriální peleta byla resuspendována v lyzačním pufru o složení uvedeném v tabulce 3.10. Peleta byla resuspendována za využití vortexu a vzniku homogenního roztoku bylo dosaženo mícháním v chladu po dobu zhruba 30 minut. Celkem bylo na peletu získanou z 1 litru bakteriální kultury použito 50 ml lyzačního pufru. Suspenze buněk byla zamrazena a skladována při teplotě -80 °C.

*Tabulka 3.10 Složení lyzačního pufru.*

Látka (zásobní roztok)	Výsledná koncentrace
10 x PBS pufr	1 x
NaCl	1 mol.dm <sup>-3</sup>
$\beta$ -ME	4 mmol.dm <sup>-3</sup>
imidazol	2 mmol.dm <sup>-3</sup>

### 3.4.3 Příprava buněčného lyzátu

Resuspendované buňky uchované při teplotě -80 °C byly šetrně rozmrazeny ve studené vodní lázni. Na 100 ml buněčné suspenze bylo přidáno 0,01 g lysosymu, se kterým byla suspenze inkubována po dobu asi 30 minut. Lysosym byl přidán za účelem enzymatického rozrušení peptidoglykanové vrstvy buněčné stěny a pomoci při lyzaci buněk. Dále byl do buněčné suspenze přidán fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF) do finální koncentrace 1 mM sloužící jako inhibitor serinových proteas.

Směs byla poté sonikována. Sonikace se řadí mezi nejpoužívanější techniky při lyzi bakteriálních buněk, konkrétně u této techniky dochází k lyzi působením ultrazvukových vln o vysoké frekvenci. Pro sonikaci buněčné suspenze byl použit program, při kterém byly aplikovány krátké pulsy (3 s), které byly střídány intervaly bez pulsů (17 s). Toto uspořádání má předejít zahřívání směsi, ke kterému by docházelo při aplikaci déle trvajících pulsů. Zahřívání rovněž předchází udržování sonikované suspenze v chladicím systému voda-led.

#### **3.4.4 Centrifugace buněčného lyzátu**

Po ukončení sonikace byl buněčný lyzát přelit do centrifugačních kyvet, které byly vyváženy. Buněčný lyzát byl centrifugován v centrifuze Hermle Z323K předchlazené na teplotu 4 °C. Centrifugace probíhalo po dobu 45 minut při 19 561 g.

#### **3.4.5 Niklová chelatační chromatografie**

Niklová chelatační chromatografie je jednou z metod využívaných pro afinitní chromatografii proteinů. Celý systém se skládá z matrix, jejíž funkcí je ukotvení ligandu a která by měla být chemicky a fyzikálně inertní, dále z raménka, které by mělo předejít sterickým zábránám a umožnit tak lepší vazbu mezi ligandem a cílovou molekulou, a nakonec ze samotného ligandu, který se specificky a reverzibilně váže na cílovou molekulu.

Kolonka na chromatografii byla naplněna přibližně 2 ml chelatační sefarysy (modifikované agarosy, s nitrilotrioctovou kyselinou (NTA) jako raménkem). Matrix byla promyta dvěma objemy kolonky deionizované vody a poté byla tzv. „nabita“ niklem – na kolonku byl aplikován 0,1 M síran nikelnatý, při jehož průchodu matrix došlo k navázání  $\text{Ni}^{2+}$  iontů na NTA. Kolonka byla následně opět promyta dvěma objemy kolonky deionizované vody a poté byla matrix ekvilibrována vazebným pufrem, jehož složení je popsáno v tabulce 3.11 (str. 44). Ekvilibrovaná matrix byla poté za mírného míchání inkubována se sonikátem po dobu 30 minut. Při tomto kroku dochází ke specifické reverzibilní vazbě cílového proteinu na nikelnaté ionty navázané na matrix. K vazbě dochází prostřednictvím histidinové kotvy, tzn. sekvence 6 histidinů, obsažené v rekombinantním proteinu. Po navázání proteinu na matrix byla kolonka promývána 200 ml roztoku 15 % elučního pufru ve vazebném pufru (složení elučního pufru je uvedeno v tab. 3.12, str.44), který má za úkol odstranit nečistoty - ostatní proteiny, které se na kolonku váží také díky obsahu histidinylových

zbytků. Ve finálním kroku byl protein uvolněn elučním pufrém obsahujícím vysokou koncentraci imidazolu.

*Tabulka 3.11 Složení vazebného pufru pro niklovou chelatační chromatografii.*

Látka (zásobní roztok)	Výsledná koncentrace
10 x PBS pufr	1 x
NaCl	0,5 mol.dm <sup>-3</sup>
β-ME	2 mmol.dm <sup>-3</sup>
imidazol	1 mmol.dm <sup>-3</sup>

*Tabulka 3.12 Složení elučního pufru pro niklovou chelatační chromatografii*

Látka (zásobní roztok)	Výsledná koncentrace
10 x PBS pufr	1 x
NaCl	0,5 mol.dm <sup>-3</sup>
β-ME	2 mmol.dm <sup>-3</sup>
imidazol	400 mmol.dm <sup>-3</sup>

### 3.4.6 SDS-PAGE elektroforéza

Pro kontrolu čistoty a množství proteinu po jednotlivých krocích purifikace se rutinně využívá metody SDS-PAGE elektroforézy (SDS – sodium dodecyl sulfát, PAGE – z angl. „polyacryl amide gel electrophoresis“). Tato metoda je založena na dělení molekul podle jejich velikosti v prostředí elektrického pole polyakrylamidového gelu. Dělení na základě velikosti je umožněno díky SDS, který ruší nekovalentní vazby v proteinu, a kromě toho dává všem proteinům negativní náboj, tudíž mobilita proteinů v gelu závisí pouze na jejich velikosti.

Pro kontrolu čistoty a množství proteinu ASK1-CRR-CD bylo využíváno 12 % SDS-PAGE gelů, jejichž složení je uvedeno v tabulce 3.13 (str.45). Příprava pufru pro separační gel je uvedena v tabulce 3.14 (str. 45). Složení zaváděcího gelu je uvedeno v tabulce 3.15 (str. 45). Příprava pufru pro zaváděcí gel je uvedena v tabulce 3.16 (str. 45). Voda, akrylamid a zaváděcí/separační pufr byly nejprve smíchány dohromady a na závěr byl do směsi přidán disíran amonný (APS – z angl. „ammonium persulfate“) a N, N, N', N'-tetramethyldiamin (TEMED), které katalyzují polymeraci akrylamidu.

**Tabulka 3.13 Příprava 12 % SDS-PAGE separačního gelu.**

<b>Látka (zásobní roztok)</b>	<b>Objem [ml]</b>
akrylamid/bis-akrylamid	3,0
pufř pro separační gel	2,0
destilovaná voda	2,5
APS (10 % vodný roztok)	0,045
TEMED	0,005

**Tabulka 3.14 Příprava pufřu pro separační gel. Destilovanou vodou doplněno na 100 ml.**

<b>Zásobní roztok</b>	<b>Objem [ml]</b>
Tris-HCl (1,5 mol.dm <sup>-3</sup> ; pH 8,8)	75
SDS (10 % vodný roztok)	4

**Tabulka 3.15 Příprava 5 % zaváděcího gelu.**

<b>Látka (zásobní roztok)</b>	<b>Objem [ml]</b>
akrylamid/bis-akrylamid	0,5
pufř pro separační gel	1,0
destilovaná voda	2,25
APS (10 % vodný roztok)	0,045
TEMED	0,005

**Tabulka 3.16 Příprava pufřu pro zaváděcí gel. Destilovanou vodou doplněno na 100 ml.**

<b>Zásobní roztok</b>	<b>Objem [ml]</b>
Tris-HCl (1 mol.dm <sup>-3</sup> ; pH 6,8)	50
SDS (10 % vodný roztok)	4

Vzorky proteinu odebírané během purifikačního procesu pro kontrolu čistoty a množství byly před samotnou elektroforézou vždy nejprve smíchány s 5x koncentrovaným vzorkovým pufřem (složení v tabulce 3.17, str.46), 5 minut zahřívány při teplotě 95 °C a následně nanášeny do jamek gelu. Elektroforéza probíhala po dobu cca 1 hodiny při napětí 200 V v prostředí 1x elektroforetického pufřu (příprava 10x koncentrovaného elektroforetického pufřu v tabulce 3.18, str.46). Po ukončení elektroforézy byl gel vždy nejprve povařen v destilované vodě a následně obarven v barvicím roztoku (příprava v tabulce 3.19, str.46). Odbarvení bylo prováděno povařením v destilované vodě.

**Tabulka 3.17 Příprava 5x vzorkového pufru.**

Látka (zásobní roztok)	Objem [ml]
Tris-HCl ( $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ ; pH 6,8)	0,6
glycerol (50 % vodný roztok)	5
SDS (10 % vodný roztok)	2
$\beta$ -ME	0,5
bromfenolová modř (1 % vodný roztok)	1
destilovaná voda	0,9

**Tabulka 3.18 Příprava 10x elektroforetického pufru.** Destilovanou vodou doplněno na 1 litr.

Látka	Hmotnost [g]
Tris	30
glycin	144
SDS	10

**Tabulka 3.19 Příprava barvicího roztoku.** Destilovanou vodou doplněno na 1 litr.

Látka	Množství
Coomassie Brilliant Blue R 250	1 g
methanol	450 ml
kyselina octová	100 ml

### 3.4.7 Dialýza

Dialýza je separační metoda umožňující odstranění nežádoucích malých molekul od makromolekul na základě pasivní difuze skrz polopropustnou membránu.

Protein získaný po niklové afinitní chromatografii se nacházel v prostředí vysoké koncentrace imidazolu, který má negativní vliv na stabilitu připravovaného proteinu. Z toho důvodu byla do purifikačního postupu zařazena dialýza, která umožňuje odstranění imidazolu. Eluovaný protein byl dialyzován v dialyzačním střevě s dělicím rozsahem 14 kD proti dialyzačnímu pufru o složení uvedeném v tabulce 3.20. Dialýza probíhala 2 hodiny.

**Tabulka 3.20 Složení dialyzačního pufru.**

Látka (zásobní roztok)	Výsledná koncentrace
Tris-HCl (pH 7,5)	$20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$
EDTA	$1 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$
NaCl	$0,5 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$
glycerol	10 % (w/V)
$\beta$ -ME	$2 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$

### 3.4.8 Koncentrace ASK1-CRR-CD

Po dialýze proteinu bylo třeba redukovat objem vzorku. Vzorek byl nejprve přefiltrován přes filtr Spartan 0,2  $\mu\text{m}$  a následně byl koncentrován v koncentrátorech s dělicím rozsahem 30 kD. Koncentrace probíhala v centrifuze Eppendorf 5804R předchlazené na teplotu 4 °C ve zhruba 3-minutových intervalech při 1 125 g. Po každém cyklu byl odstraněn filtrát a vzorek uvnitř koncentrátoru byl promíchán. Tímto způsobem se postupovalo do doby, než byl objem vzorku zredukován na objem 2 ml.

### 3.4.9 Gelová permeační chromatografie

Gelová permeační chromatografie je metoda, která rozděluje látky na základě jejich hydrodynamického poloměru. Systém se skládá z mobilní fáze, kterou je pufr vyhovující svými vlastnostmi připravovanému proteinu, a stacionární fáze, kterou je naplněna kolona. Stacionární fáze je tvořena částicemi, které v sobě obsahují otvory o různých velikostech, a dělení je založeno na tom, že malé molekuly jsou při průchodu stacionární fází zpoždovány tím, že vstupují do přítomných otvorů, zatímco velké molekuly, které se do otvorů nevejdou, tyto částice „obtékají“ a kolonou tak procházejí rychleji.

Při purifikaci ASK1-CRR-CD byla použita kolona HiLoad 26/600 Superdex 200 (superdex – komerční název pro dextran kovalentně navázaný na vysoce zesítěnou agarosu). Vzorek proteinu koncentrovaný na objem 2 ml byl přefiltrován přes filtr Spartan 0,2  $\mu\text{m}$  a následně nastříknut na purifikační kolonu předem ekvilibrovanou purifikačním pufrem o složení uvedeném v tabulce 3.21. Separace na koloně probíhala za stabilního průtoku pufru 2 ml/minutu a byly sbírány frakce obsahující požadovaný protein. Čistota frakcí byla zkontrolována za využití SDS-PAGE elektroforézy a vyhovující frakce byly následně sloučeny, koncentrovány a výsledná koncentrace byla změřena na přístroji Nanodrop. Připravený protein byl zamražen a skladován při teplotě -80 °C.

*Tabulka 3.21 Složení pufru pro gelovou permeační chromatografii.*

Látka (zásobní roztok)	Výsledná koncentrace
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mmol.dm <sup>-3</sup>
EDTA	1 mmol.dm <sup>-3</sup>
NaCl	0,2 mol.dm <sup>-3</sup>
glycerol	10 % (w/V)
β-ME	2 mmol.dm <sup>-3</sup>

### 3.5 Biofyzikální a strukturní charakterizace ASK1-CRR-CD

#### 3.5.1 Analytická ultracentrifugace

Analytická ultracentrifugace je metoda vhodná pro studium hydrodynamických, či termodynamických vlastností biomolekul, jejíž nespornou výhodou je, že biomolekuly jsou během experimentu studovány volně v roztoku. Díky tomu nevznikají komplikace v důsledku interakcí částic s pevnými nosiči. Další výhodou této metody je možnost aplikovat ji na poměrně široké koncentrační rozpětí studovaných molekul [42].

Během analytické ultracentrifugace jsou studované molekuly v roztoku nanášeny do speciálních centrifugačních kyvet, které mají průhledná okénka, což umožňuje optická měření. Distribuce molekul rozpuštěné látky je následně během experimentu sledována optickým systémem. V současné době jsou k monitorování distribuce molekul k dispozici tři optické systémy založené na absorpci, interferenci nebo fluorescenci. Nejčastěji využívané techniky analytické ultracentrifugace jsou metoda sedimentační rychlosti a metoda sedimentační rovnováhy [43].

Při metodě sedimentační rychlosti je experiment prováděn za vysokých úhlových rychlostí, čímž je docíleno toho, že na vzorek působí velké odstředivé síly. To má za následek rychlou sedimentaci molekul, vznik ostrého rozhraní mezi oblastí bez proteinu v horní části kyvety a oblastí s konstantní koncentrací proteinu ve zbytku kyvety. Jedná se o hydrodynamickou techniku, která umožňuje určení tvaru molekuly o známé hmotnosti, určení molekulové hmotnosti, či identifikaci přítomnosti různých molekul lišících se svou hmotností [43, 44].

Sedimentační rovnováha je termodynamickou metodou, při které se nedosahuje tak velkých úhlových rychlostí jako v případě metody sedimentační rychlosti. Analyzované látky při experimentu sedimentují, zároveň na ně ale v opačném směru působí difuze. Po určité době dochází k tomu, že se tyto dvě protichůdné síly dostanou do rovnováhy v každém bodě kyvety a distribuce koncentrace studovaných biomolekul v kyvetě monotónně vzrůstá. Pomocí této metody lze určit molekulovou hmotnost biomolekul, jejich oligomerní stav, rovnovážné konstanty tvorby komplexů, či jejich stechiometrii [43, 44].



Při analýze oligomerního chování ASK1-CRR-CD byla využita metoda sedimentační rychlosti. Měření proběhlo na analytické ultracentrifuze ProteomLab™ XL-1 (Beckman Coulter, USA).

Protein ASK1-CRR-CD připravený postupem popsaným v předcházejících kapitolách byl nejprve převeden do pufru vhodného pro analytickou ultracentrifugaci. Byl dialyzován přes noc proti pufru o složení uvedeném v tabulce 3.22. Následně byly připraveny tři různé koncentrace proteinu – 0,4 mg/ml; 1,05 mg/ml a 9,09 mg/ml. Takto připravené vzorky byly dále centrifugovány při úhlové rychlosti 42000 RPM a analyzovány za využití interferenční optiky. Hustota a viskozita pufru a parciální specifické objemy proteinů byly vypočítány za využití programu SEDNTERP a distribuce sedimentačních koeficientů  $c(s)$  byly získány za využití softwaru SEDFIT. Zisk a zpracování dat bylo realizováno ve spolupráci s Mgr. Olívií Petrvalskou, Ph.D..

**Tabulka 3.22 Složení pufru pro analytickou ultracentrifugaci.**

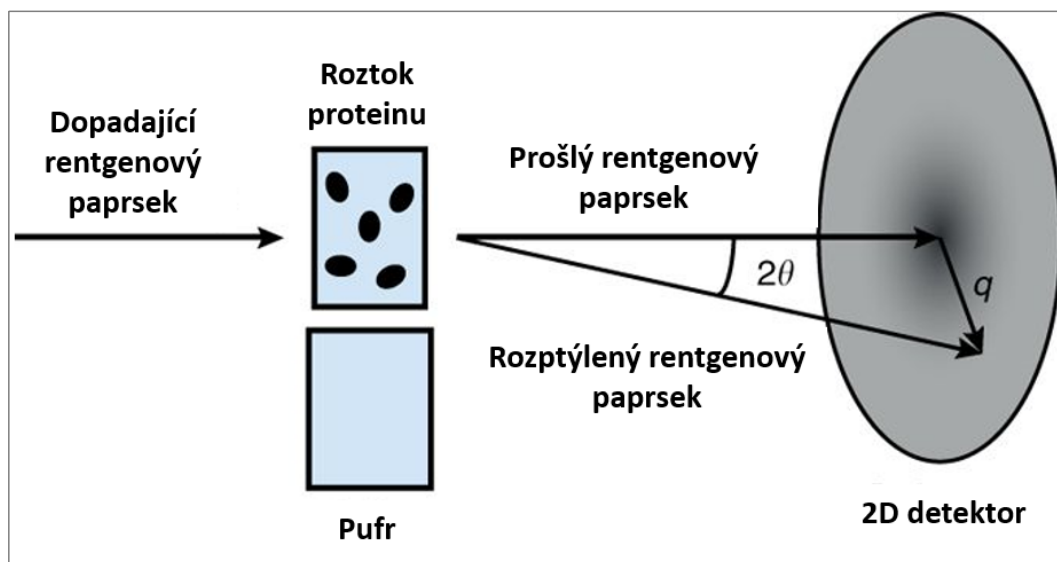
Látka (zásobní roztok)	Výsledná koncentrace
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mmol.dm <sup>-3</sup>
EDTA	1 mmol.dm <sup>-3</sup>
NaCl	0,2 mol.dm <sup>-3</sup>
TCEP	1 mmol.dm <sup>-3</sup>

### 3.5.2 Maloúhlový rozptyl rentgenového záření

Maloúhlový rozptyl rentgenového záření neboli SAXS (z anglického „small angle X-ray scattering“) je technika, při které je pod malým úhlem měřen elastický rozptyl rentgenového záření. Jedná se o velice účinný nástroj vhodný pro strukturní charakterizaci proteinů v roztoku, který nám poskytuje informace o velikosti a tvaru proteinů a proteinových komplexů. Za využití této metody je možné charakterizovat molekuly v poměrně širokém rozsahu velikostí - od jednotek kD po GD. Speciálně při využití velice intenzivních synchrotronových zdrojů rentgenového záření se jedná o velmi rychlý experiment [45].

Při samotném experimentu je roztok proteinu o koncentraci typicky větší než 1 mg/ml a objemu v rozmezí 5-30  $\mu$ l ozařován kolimovaným svazkem monochromatického rentgenového záření a na detektoru je poté zaznamenávána intenzita rozptýleného záření jako funkce rozptylového úhlu (obr. 3.5, str. 50). Pro eliminaci přímého paprsku se využívá tzv. „beam stop“, jehož velikost a umístění hrají důležitou roli pro určení minimálního úhlu

měřeného v rámci daného experimentu. Součástí experimentu je změření intenzity záření rozptýleného rozpouštědlem, přičemž tato intenzita je následně odečtena od intenzity vzorku v roztoku. Výsledná rozptylová křivka v sobě nese informace o tvaru a velikosti zkoumaných částic [45, 46].



**Obrázek 3.5** Schéma maloúhlového rozptylu rentgenového záření. Kolimovaný paprsek rentgenového záření dopadá na měřený vzorek proteinu či samotný pufr a na detektoru je zaznamenávána intenzita rozptýleného záření, která je funkcí rozptylového vektoru  $q$ . Upraveno dle [48].

Pokud uvažujeme, že je vzorek homogenní, monodisperzní a částice spolu neinteragují, pak je závislost intenzity  $I$  na parametru  $q$ , což je tzv. „momentum transfer“, který je funkcí rozptylového úhlu  $\theta$  ( $q = 4\pi \sin(\theta)/\lambda$ ), dána:

$$I(q) = 4\pi \int_0^{D_{max}} P(r) \frac{\sin(qr)}{qr} dr \quad (\text{Rovnice 1})$$

kde  $P(r)$  je distribuční funkce vzdáleností a  $D_{max}$  je maximální vzdálenost v rámci rozptylující molekuly [47]. Distribuční funkce vzdáleností  $P(r)$  je s intenzitou  $I$  vztažena Fourierovou transformací:

$$P(r) = \frac{r}{2\pi^2} \int_0^\infty I(q) \cdot q \cdot \sin(qr) \cdot dq \quad (\text{Rovnice 2})$$

Pro malá  $q$  platí tzv. Guinierova aproximace:

$$\ln \frac{I(q)}{I(0)} = -\frac{q^2 R_g^2}{3} \quad (\text{Rovnice 3})$$

Tzv. Guinierův výnos  $\ln[I(q)]$  vs  $q^2$  by měl být lineární pro  $qR_g < 1,3$  a umožňuje získat hodnoty  $R_g$  a  $I(0)$ . Nelinearita Guinierova výnosu naznačuje agregaci vzorku nebo repulze mezi částicemi [47].

Pro měření SAXS byl připraven vzorek proteinu ASK1-CRR-CD o koncentracích 0,435 mg/ml; 0,755 mg/ml; 0,98 mg/ml; 1,93 mg/ml; 2,92 mg/ml a 5,86 mg/ml. Tato koncentrační série byla měřena za využití klasické vsádkové metody, kdy byla měřena příslušná koncentrace proteinu a zároveň s tím pufr, ve kterém byl protein rozpuštěn.

Pro porovnání bylo kromě této klasické vsádkové metody využito také měření rozptylu rentgenového záření při uspořádání, u kterého samotnému měření předcházela gelová permeační chromatografie (uspořádání SEC-SAXS). Zavedení toho kroku má na měření dva efekty, jednak dochází k naředění proteinu a rozptyl rentgenového záření je tak měřen na velmi nízkých koncentracích, kromě toho by měl tento krok také zajistit odstranění agregovaných proteinů. Pro gelovou permeační chromatografii byla využita kolona Superdex™ 200 Increase 10/300, na kterou bylo aplikováno 100  $\mu$ l proteinu o koncentraci 1,51 mg/ml, průtok činil po celou dobu 0,5 ml/min.

Při obou postupech byl protein ASK1-CRR-CD rozpuštěn v pufru o složení uvedeném v tabulce 3.23. Měření koncentrací všech vzorků předcházela jejich centrifugace, aby byly odstraněny případné agregované částice, na které jsou rozptylové techniky velmi citlivé. Všechna synchrotronová SAXS data byla získána na pracovišti P12 spravovaném Evropskou laboratoří pro molekulární biologii na okruhu Petra III (DESY, Hamburg, Německo).

**Tabulka 3.23 Složení pufru pro SAXS**

Látka (zásobní roztok)	Výsledná koncentrace
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mmol.dm <sup>-3</sup>
EDTA	1 mmol.dm <sup>-3</sup>
NaCl	0,2 mol.dm <sup>-3</sup>
Glycerol	5 % (w/V)
TCEP	1 mmol.dm <sup>-3</sup>

### 3.5.3 Modelování ASK1-CRR-CD metodou „rigid body“

Při tomto typu modelování se využívá již vyřešených vysoce rozlišených struktur jednotlivých komponent, ať už se jedná o proteiny makromolekulárního komplexu nebo o domény vícedoménového proteinu, které jsou vzájemně orientovány tak, aby co nejlépe odpovídaly experimentálním datům získaným pomocí rozptylových technik. V případě vícedoménových proteinů se často stává, že jednotlivé domény, jejichž vysoce rozlišené struktury jsou k dispozici, jsou spojeny více či méně flexibilními fragmenty, jejichž struktury k dispozici nejsou. V takové situaci se kombinují přístupy modelování „rigid body“ a „ab initio“, kdy jsou hledány optimální pozice a vzájemné orientace domén/podjednotek a zároveň pravděpodobné konformace flexibilních částí připojených na příslušná rezidua domén reprezentovaných jako řetězce tzv. „dummy“ reziduí [49].

Modelování monomeru proteinu ASK1-CRR-CD bylo provedeno za využití programu CORAL (z angl. „complexes with random loops“) a dat získaných přístupem SEC-SAXS [50]. Jako vstupní data byly do programu vloženy kromě experimentální rozptylové křivky monomeru také krystalové struktury domén ASK1-CRR a ASK1-CD (v PDB databázi dostupné pod kódy 5ULM a 2CLQ) a krystalová struktura proteinu GB1 (v PDB databázi dostupná pod kódem 2QMT), který byl součástí exprimovaného proteinu ASK1-CRR-CD z důvodu udržení jeho stability, a dále také konfigurační soubor udávající počet reziduí, jejichž struktura úplně chybí. Na základě těchto dat byl vždy vypočítán strukturní model, jehož shoda s experimentálními rozptylovými daty byla charakterizována hodnotou  $\chi^2$ :

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_i \left[ \frac{l(q_i)_{exp} - c l(q_i)_{calc}}{\sigma(q_i)} \right]^2, \quad (\text{Rovnice 4})$$

kde  $c$  je škálovací faktor,  $\sigma(q_i)$  experimentální chyba a  $N$  počet bodů. Tímto způsobem bylo vygenerováno 40 strukturních modelů pro monomer ASK1-CRR-CD [51].

Modely získané pomocí programu CORAL byly podrobeny shlukové analýze za využití programu UCSF Chimera [52]. Tím bylo docíleno rozdělení 40 modelů monomerů do 10 skupin obsahujících navzájem se podobající modely. Z těchto skupin byly vybrány dvě nejvíce zastoupené, ze kterých byly vybrány reprezentativní modely.

### 3.5.4 Chemické zesíťení spojené s hmotnostní spektrometrií

Chemické zesíťení, jinak řečeno spojení dvou či více molekul kovalentními vazbami, se dnes nejčastěji provádí za využití esterů N-hydroxysukcinimidů (NHS), homobifunkčních činidel tvořících spojení především mezi zbytky aminokyseliny lysinu, které se nacházejí ve vzájemné blízkosti. Vzdálenost aminokyselinových zbytků, při kterých může dojít k vytvoření spojení, lze ovlivnit volbou konkrétního síťovacího činidla, která se od sebe liší vzdáleností mezi dvěma reaktivními funkčními skupinami na svých koncích. Jakmile dojde k vytvoření spojení, vzniká prostor pro studium za normálních podmínek transientních interakcí [53, 54].

Chemické zesíťení se stalo atraktivní technikou pro studium struktury proteinových komplexů zejména díky nízké spotřebě vzorku a krátkým časům analýzy. Kromě toho, vzdálenostní omezení dostupná díky identifikaci zesíťených peptidů mohou být použita pro stavbu či validaci modelu proteinu [55].

Pro účely chemického zesíťení za využití N-reaktivních činidel disukcinimidyl-glutarátu (DSG) a disukcinimidyl-sukcinátu (DSS) byl protein ASK1-CRR-CD dialýzou převeden do pufru o složení uvedeném v tabulce 3.24 (str. 54). Pro usnadnění identifikace a validaci zesíťovaných peptidů byla činidla v roztoku se svými 6x deuterovanými analogy v molárním poměru 1:1. Síťovací činidla v DMSO o koncentraci 10 mg/ml byla přidávána k proteinu o koncentraci 1 mg/ml v 10-ti nebo 50-ti násobném molárním nadbytku do finálního objemu 20  $\mu$ l. Připravené směsi byly inkubovány 1 hodinu při 22 °C.

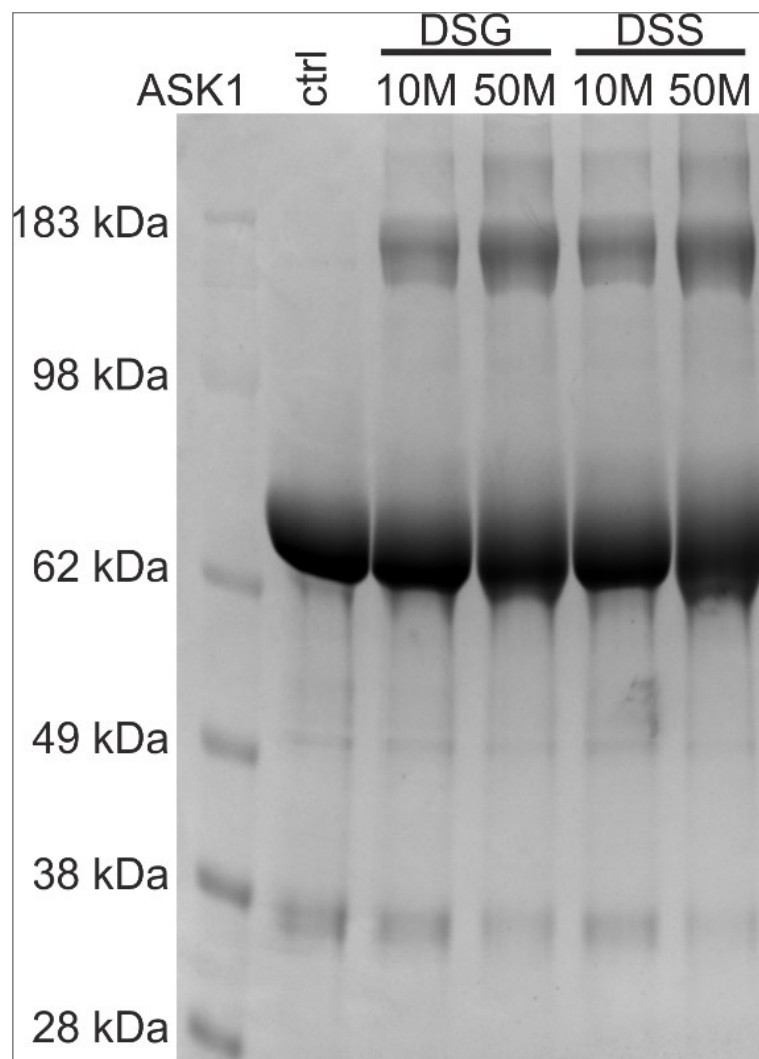
Vzorky byly následně separovány pomocí NuPAGE na gradientních 4-12 % Bis-Tris gelech ve 20x zředěném komerčním MES SDS pufru (obr. 3.6, str. 55). Zóny velikostně odpovídající zesíťovanému dimeru byly z gelu vyříznuty. Inkubací s 50 mM DTT po dobu 45 minut při teplotě 60 °C byla zajištěna redukce cysteinů. Poté probíhalo štěpení proteinu trypsinem přes noc při 37 °C, přičemž poměr enzymu k proteinu byl 1:20 (wt/wt). Extrahované peptidy byly během 5 minut odsoleny na Trap koloně (Acquity M-class C18, 100 Å, 5  $\mu$ m, 2 G, V/V, 180  $\mu$ m x 20 mm, Waters, USA) při průtokové rychlosti 20  $\mu$ l/min. Poté byly peptidy separovány na analytické koloně s reverzní fází (Acquity BEHC18, 300 Å, 1,7  $\mu$ m, 300  $\mu$ m x 150 mm) pomocí 1290 UHPLC (Agilent technologies, USA) při průtokové rychlosti 10  $\mu$ l/min. Při separaci byla použita rozpouštědla A (acetonitril a kyselina mravenčí ve vodě v poměru 2 % / 0,1 %) a B (kyselina mravenčí a acetonitril ve vodě v poměru 0,1 % / 98 %). Peptidy byly separovány za využití gradientu: 1-10 % B po dobu

1 minuty, dále 10-45 % B po dobu 19 minut a nakonec 45-95 % B po dobu 5 minut. Kolona byla temperována na 50 °C a byla propojena s hmotnostním spektrometrem FT-ICR (15T solariX, Bruker Daltonics, USA) za využití ionizace elektrosprejem. Přístroj pracoval v módu „data-independent analysis“ tzn. na datech nezávislé analýze a byl kalibrován na výslednou přesnost lepší než 2 ppm.

Zisk a zpracování dat bylo provedeno za využití programu fimsControl 2.1.0 a DataAnalysis 4.2 (Bruker Daltonics, USA). Zesíťované peptidy byly identifikovány pomocí softwaru StavroX (3.6.0.1) [56]. Chemické zesítění spojené s hmotnostní spektrometrií bylo realizováno RNDr. Petrem Pompachem, Ph.D. (Biotechnologický ústav AV ČR, BIOCEV, Vestec).

**Tabulka 3.24 Složení pufru pro chemické zesítění**

<b>Látka (zásobní roztok)</b>	<b>Výsledná koncentrace</b>
HEPES (pH 7,5)	20 mmol.dm <sup>-3</sup>
NaCl	0,2 mol.dm <sup>-3</sup>
glycerol	10 % (w/V)
DTT	5 mmol.dm <sup>-3</sup>



**Obrázek 3.6** Gradientní 4-12 % Bis-Tris NuPAGE gel. Zobrazen je výsledek chemického zesíťení za využití síťovacích činidel DSG a DSS v 10-ti nebo 50-ti molárním nadbytku vůči proteinu ASK1-CRR-CD. Na obrázku jsou viditelné zóny odpovídající dimeru tohoto proteinu v oblasti molekulových vah ~180 kD.

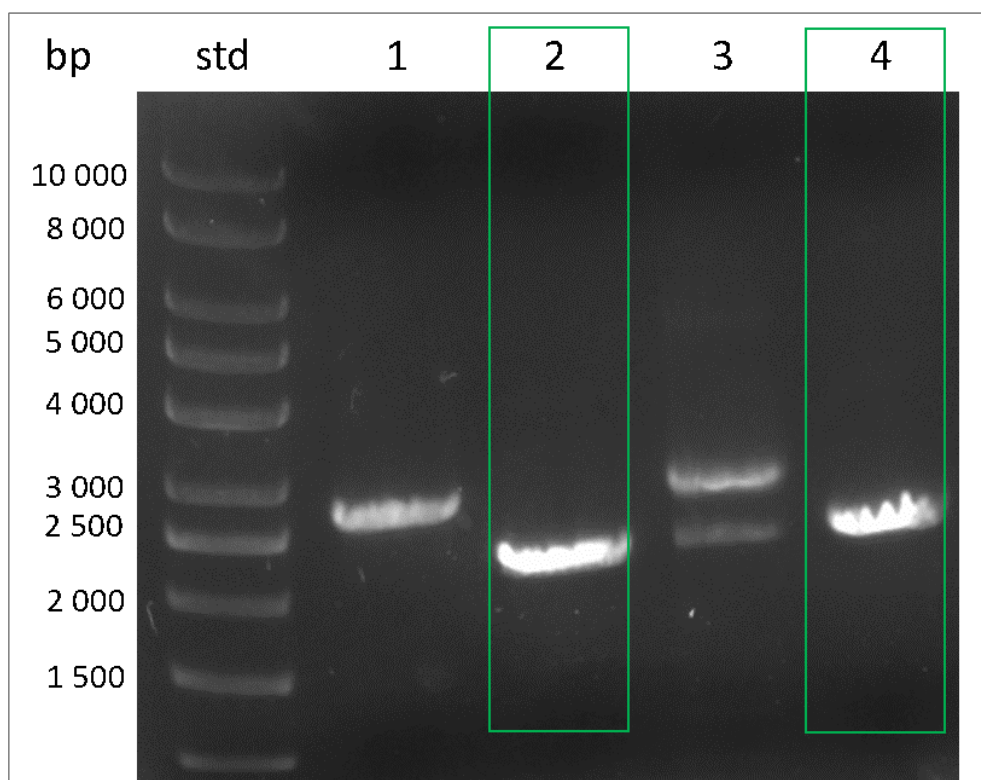
## 4. Výsledky

### 4.1 Příprava plasmidu pRSFDuet-1/pST39 s vloženou sekvencí pro ASK1-CRR-CD

#### 4.1.1 Amplifikace cílového genu pomocí PCR

Prvním krokem při přípravě konstruktu ASK1-CRR-CD v příslušných expresních vektorech byla amplifikace vybraného úseku sekvence lidské proteinkinasy ASK1 pomocí PCR. Pomocí navržených oligonukleotidů zohledňujících místa pro vložení cílového genu v jednotlivých plasmidech byla provedena amplifikace sekvence obsahující rezidua 269-973, která byla následně dále upravována za využití PCR vnášející mutaci.

Velikost a čistota výsledných produktů byla zkontrolována pomocí horizontální 1 % agarosové elektroforézy. Na obrázku 4.1 můžeme vidět rozdílnou rychlost migrace pro různě



**Obrázek 4.1** 1 % agarosový gel s ASK1 (269-973) amplifikovanými pomocí PCR. Na levé straně obrázku jsou zobrazeny rozdělené fragmenty standardu o uvedených velikostech, v jamce č. 2 je vidět produkt ASK1 269-973 určený pro vložení do plasmidu pRSFDuet-1, v jamce č. 4 se nachází produkt ASK1 269-973 určený pro vložení do plasmidu pST39. V jamkách č. 1 a 3 se nacházejí delší produkty (88-973), které nejsou předmětem této práce. Elektroforéza probíhala při napětí 90 V po dobu 50 minut.

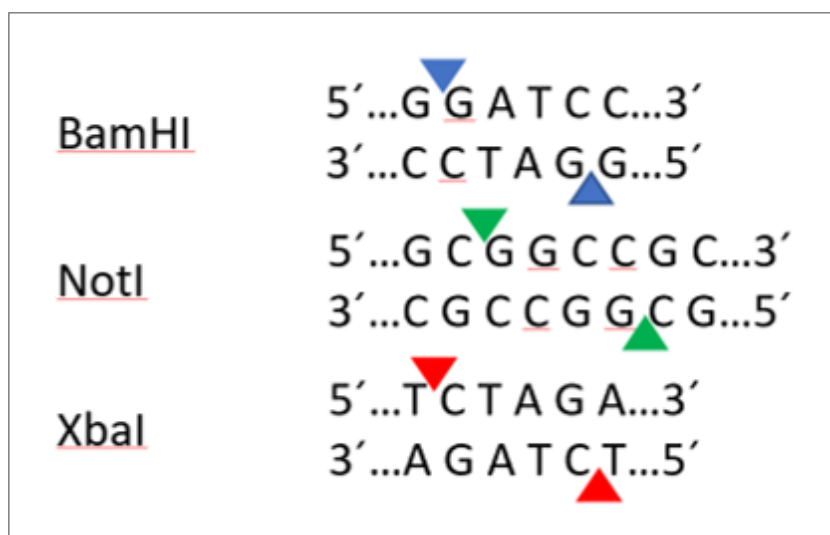


dlouhé fragmenty, což je způsobeno tím, že na tomto agarosovém gelu byla paralelně kontrolována čistota dalších konstruktů ASK1, jejichž studium není předmětem této práce. Jako standard bylo použito 5 µl komerčního standardu „1 kb DNA ladder“ (NEB), 3 µl amplifikovaných úseků ASK1 v rozmezí reziduí 269-973 smíchaných se 2 µl vzorkového pufru bylo nanášeno do jamek č. 2 a 4. V jamce č. 2 byl produkt amplifikovaný za použití oligonukleotidů vnášejících štěpná místa pro BamHI a NotI a tedy určený pro vložení do plasmidu pRSFDuet-1, v jamce č. 4 byl produkt amplifikovaný za použití oligonukleotidů vnášejících štěpná místa pro XbaI a BamHI a tedy určený pro vložení do plasmidu pST39.

Výsledné produkty PCR poskytly v obou případech pouze jednu zónu, tudíž nebylo nutné přistoupit k čištění pomocí vyřezávání proužků z gelu, ale PCR reakční směsi s amplifikovanými produkty byly pouze přečištěny za využití „GeneElute PCR Clean-up“ (Sigma), čímž byly připravené pro další postup.

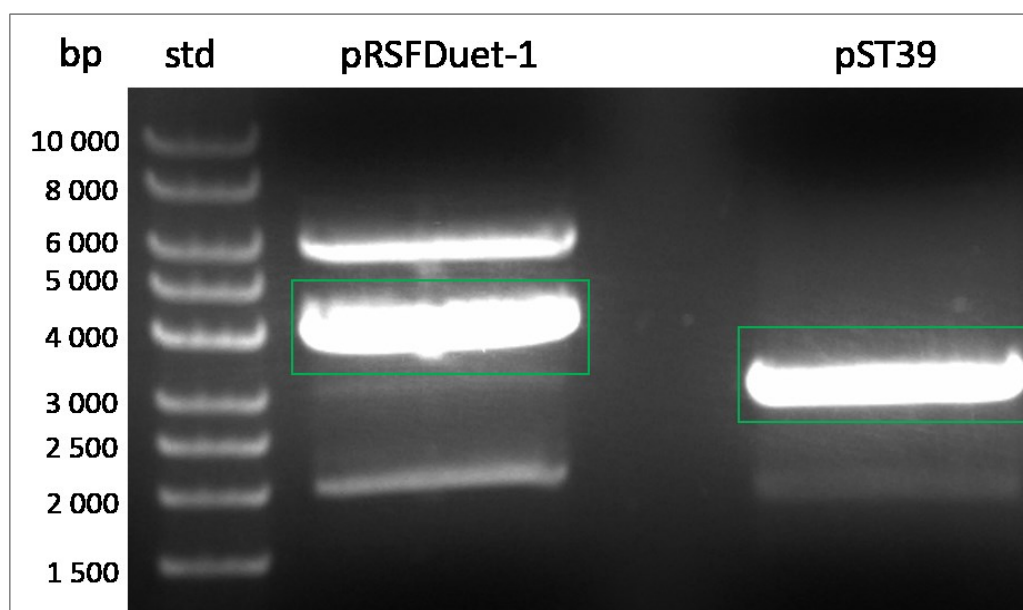
#### 4.1.2 Příprava dvojité štěpených plasmidů pRSFDuet-1/pST39

Pro vložení sekvence ASK1 269-973 do vybraných plasmidů bylo třeba plasmidy linearizovat, čehož bylo dosaženo dvojitým štěpením restričními endonukleasami. Pro štěpení plasmidu pRSFDuet-1 byly využity restriční endonukleasy BamHI a NotI, pro štěpení plasmidu pST39 byly použity endonukleasy XbaI a BamHI. Všechny tyto enzymy štěpí sekvence DNA za vzniku kohezních konců, což je znázorněno na obrázku 4.2.



**Obrázek 4.2 Štěpná místa restričních endonukleas BamHI, NotI a XbaI.**  
*V uvedených sekvencích jsou trojúhelníky naznačena štěpná místa pro zmíněné restriktasy. Uvedený způsob štěpení dává vzniknout kohezním koncům.*

Po dokončení štěpení plasmidů pRSFDuet-1 a pST39 byl celý objem obou reakcí nanesen do jamek 0,8 % agarosového gelu pro oddělení forem plasmidu. Na obrázku 4.3 můžeme vidět, že oba plasmidy v agarosovém gelu putují ve 3 formách. Nejpomalejší frakce (nejvíce nahoře) odpovídá relaxované cirkulární formě, prostřední frakce odpovídá dvojité štěpené linearizované formě a nejrychlejší frakce odpovídá superspiralizované formě. Dvojité štěpené linearizované formy plasmidů, zvýrazněné v obrázku zeleným rámečkem, byly vyříznuty z gelu a dále přečištěny za využití kitu „GenElute™ Gel Extraction Kit“.

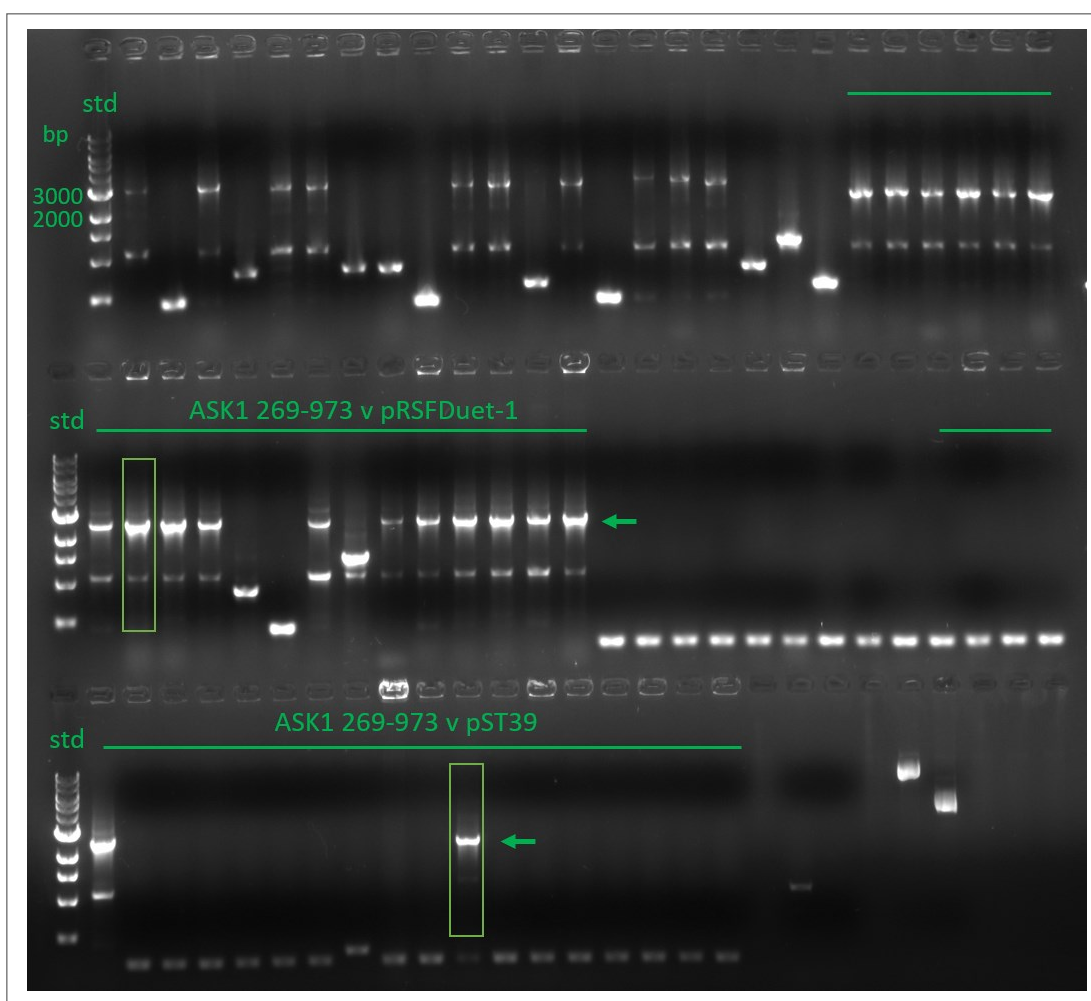


**Obrázek 4.3** 0,8 % agarosový gel s dvojité štěpenými plasmidy pRSFDuet-1 a pST39. Na obrázku můžeme kromě linearizované dvojité štěpené formy, která byla vyříznuta z gelu a přečištěna, dále pozorovat cirkulární relaxovanou formu putující pomaleji a superspiralizovanou formu putující rychleji než linearizovaná forma.

#### 4.1.3 Ligace ASK1 269-973 do plasmidů pRSFDuet-1/pST39

DNA kódující ASK1 (269-973) byla při ligační reakci vložena do plasmidů pRSFDuet-1 a pST39, kterými byly následně transformovány kompetentní buňky *E. Coli* TOP10. Pro potvrzení úspěšnosti transformace bylo provedeno PCR z bakteriálních kolonií. Pokud by kolonie obsahovaly pouze prázdný plazmid, nevznikl by během PCR žádný produkt, neboť použité oligonukleotidy jsou specifické pro vkládaný úsek DNA. Za předpokladu úspěšného vložení cílového genu se dá naopak očekávat vznik produktu detekovatelného na agarosové elektroforéze.

Na obrázku 4.4 je zobrazen gel po 1 % agarosové elektroforéze. Jako standard byla použita komerční směs DNA fragmentů „1kB DNA ladder“ (Sigma) a samotné vzorky byly připraveny přidáním 3,5  $\mu$ l 6x koncentrovaného vzorkového pufru do 20  $\mu$ l směsi po PCR z bakteriálních kolonií. Tato směs byla zamíchána a na gel byla nanášena vždy v objemu 5  $\mu$ l. Jak je vidět na obrázku, zdaleka ne ve všech případech se podařilo úspěšně vložit gen pro ASK1 do cílového plasmidu a pro další práci tedy bylo nutné vybrat pouze kolonie obsahující plasmid včetně vkládané sekvence. Vybrané kolonie byly využity pro přípravu bakteriálních kultur, ze kterých byla izolována DNA, jejíž správnost byla následně potvrzena sekvenací (provedeno firmou Eurofins Genomics).



**Obrázek 4.4** Gel po 1 % agarosové elektroforéze vzorků z PCR s koloniemi bakterií. Sloupce odpovídající amplifikovaným konstruktům ASK1 (269-973) jsou zvýrazněny zelenou čarou. Produkty o správné velikosti jsou označeny zelenou šipkou, přičemž konkrétní kolonie, které byly vybrány pro další práci, jsou zvýrazněny zeleným rámečkem. Elektroforéza probíhala při napětí 100 V po dobu 45 minut.

#### 4.1.4 Mutace pro vnesení stop kodonu na pozici S942

Vnesení mutace S942stop bylo provedeno opět za využití PCR. Pro amplifikaci byly využity navržené mutagenezní oligonukleotidy a po proběhnutí reakce byla reakční směs ošetřena restrikcí enzymem DpnI umožňujícím odstranění templátové DNA. Tato směs byla použita pro transformaci buněk *E.Coli* TOP10 a z kolonií vyrostlých na agarových miskách byly připraveny bakteriální kultury, které byly poté použity na izolaci plasmidové DNA. Přítomnost mutace byla ověřena sekvenací (provedeno firmou Eurofins Genomics). Tímto způsobem bylo dosaženo přípravy konstruktu ASK1-CRR-CD v plasmidech pRSFDuet-1 a pST39. Plasmidovou DNA byly transformovány kompetentní buňky *E.Coli* BL21 (DE3), které byly následně využívány pro expresi proteinu.

#### 4.2 Optimalizace expresních podmínek konstruktu ASK1-CRR-CD

Po dokončení přípravy plasmidů obsahujících DNA kódující ASK1-CRR-CD bylo možné přistoupit k expresním testům.

Expresní vektory pRSFDuet-1 i pST39 obsahují před vkládaným genem T7 promotor, pro jehož funkčnost je třeba přítomnost RNA polymerasy z bakteriofága T7, neboť bakteriální RNA polymeráza tuto sekvenci nerozeznává. Z toho důvodu je do genomu některých bakteriálních kmenů uměle vložen gen pro T7 polymerasu (tyto bakteriální kmeny následně nesou označení „DE3“), kterému předchází sekvence tzv. *lac* promotoru. Předtím, než dojde v bakteriálním systému k indukci, je na *lac* promotor navázán represorový protein, který brání expresi proteinu. V okamžiku přidání indukčního činidla (IPTG) dochází k uvolnění represorového proteinu, expresi T7 polymerasy a následně k transkripci cílového genu.

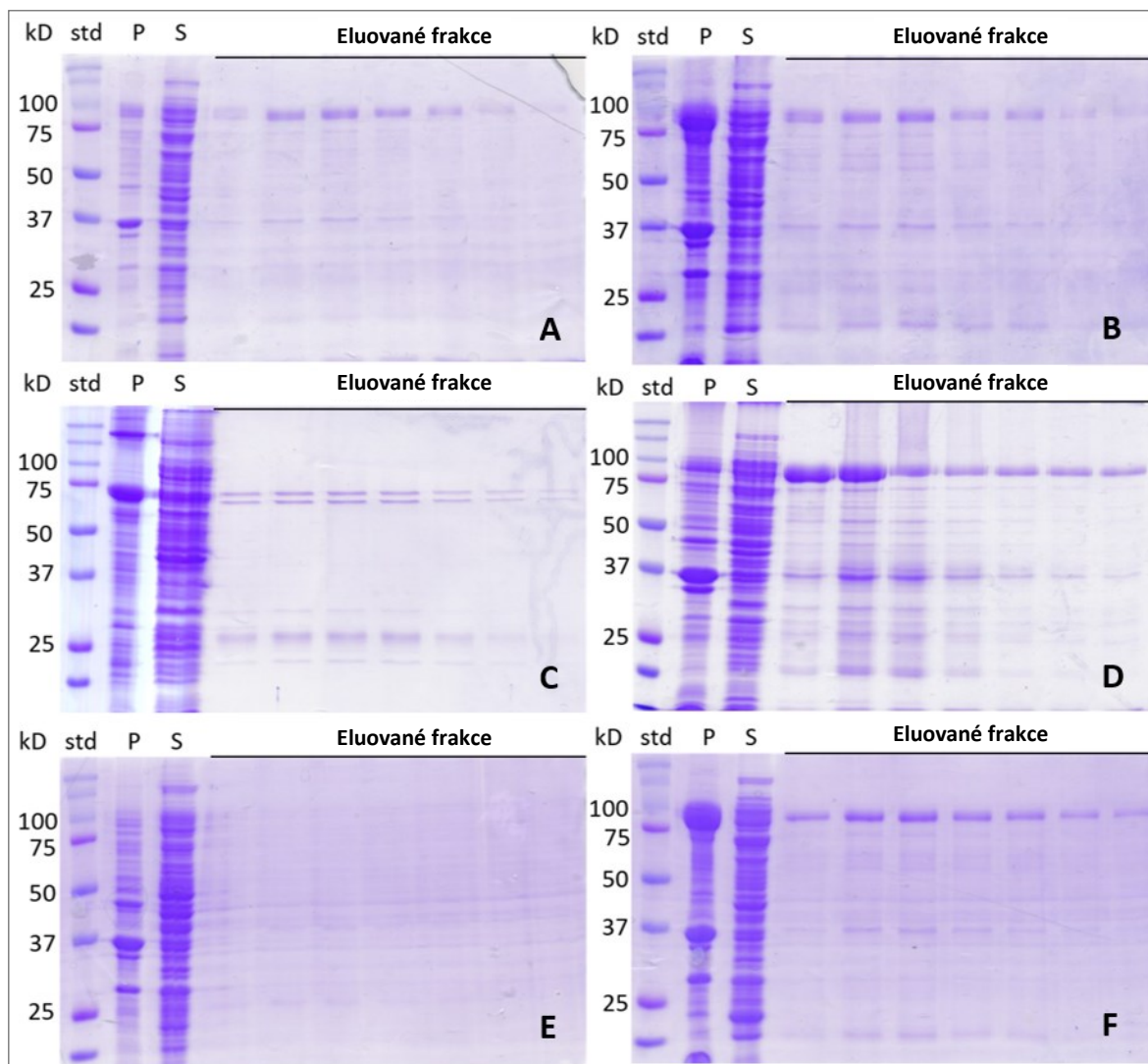
Při optimalizaci expresních podmínek proteinu ASK1-CRR-CD byly vyzkoušeny různé kombinace bakteriálního kmene (BL21 (DE3) / Rosetta (DE3) - kmen odvozený od BL21 optimalizovaný pro expresi lidských proteinů obsahujících kodony vzácně se vyskytující u *E.Coli*), plazmidu (pRSFDuet-1 / pST39), kultivačního média (LB / TB) a kultivační teploty (25 °C / 20 °C / 18 °C).

Přehled vyzkoušených podmínek je uveden v tabulce 4.1 (str.61).

**Tabulka 4.1** Podmínky testované během optimalizace exprese proteinu *ASK1-CRR-CD*. Zeleně označena je podmínka poskytující nejvyšší expresi proteinu a která byla z toho důvodu vybrána pro další práci.

Bakteriální kmen	Plasmid	Kultivační médium	Teplota
BL21	pRSFDuet-1	LB	25 °C
BL21	pRSFDuet-1	TB	25 °C
BL21	pST39	LB	25 °C
BL21	pRSFDuet-1	LB	20 °C
Rosetta	pRSFDuet-1	LB	25 °C
Rosetta	pRSFDuet-1	TB	25 °C
<b>BL21</b>	<b>pRSFDuet-1</b>	<b>LB</b>	<b>18 °C</b>

Níže následují obrázky 12 % SDS-PAGE gelů (obrázek 4.5, str.62), na které byly nanášeny vzorky proteinu po niklové chelatační chromatografii a které poskytují informaci o tom, zda byl při dané podmínce protein exprimován, v jakém množství a případně v jaké čistotě.



**Obrázek 4.5** Polyakrylamidové gely (12 %) obarvené Coomassie brilliant blue R 250 získané po SDS-PAGE se vzorky z niklové chelatační chromatografie po expresi ASK1-CRR-CD. A – BL21, pRSFDuet-1, LB, 25°C; B – BL21, pRSFDuet-1, TB, 25°C; C – BL21, pST39, LB, 25°C; D – BL21, pRSFDuet-1, LB, 20°C; E – Rosetta, pRSFDuet-1, LB, 25°C; F – Rosetta, pRSFDuet-1, TB, 25°C. Do 1.jamky označené jako „std“ byly naneseny 3  $\mu$ l standardu „Precision Plus Protein<sup>TM</sup> Standards, Dual Color“, dále do 2.jamky označené „P“ bylo naneseno 15  $\mu$ l zředěné pelety po centrifugaci sonikátu smíchaného s 5  $\mu$ l vzorkového pufru, do 3.jamky označené „S“ bylo naneseno 15  $\mu$ l zředěného supernatantu po centrifugaci sonikátu smíchaného s 5  $\mu$ l vzorkového pufru a do zbylých jamek bylo naneseno vždy 15  $\mu$ l z elučních frakcí smíchaných opět s 5  $\mu$ l vzorkového pufru. SDS-PAGE probíhala 1 hodinu při napětí 200 V.

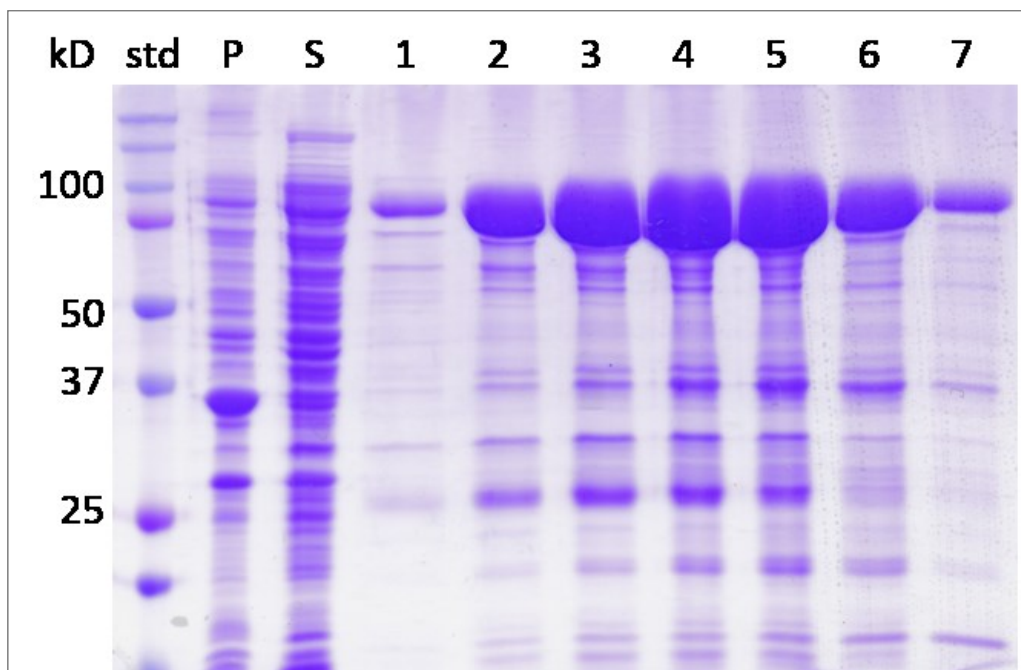
### **4.3 Purifikace proteinu ASK1-CRR-CD**

Po nalezení vhodných expresních podmínek pro protein ASK1-CRR-CD bylo přistoupeno k jeho přípravě z většího objemu kultivačního LB média. Purifikační protokol ASK1-CRR-CD je složený ze dvou purifikačních kroků, niklové chelatační chromatografie a gelové permeační chromatografie, které jsou odděleny dialýzou zařazenou do protokolu za účelem snížení koncentrace imidazolu v roztoku proteinu. Po obou chromatografických krocích byl získaný protein podroben SDS-PAGE, aby bylo zkontrolováno jeho množství a čistota. Vybraný purifikační postup poskytuje protein v poměrně malém množství (což je dáno nízkou stabilitou), nicméně v čistotě dostačující pro biofyzikální charakterizaci.

#### **4.3.1 Niklová chelatační chromatografie**

Protein byl při niklové chelatační chromatografii eluován gradientem koncentrace imidazolu. K eluci byl využit eluční pufr o koncentraci imidazolu 100 mM, 150 mM, 200 mM, 300 mM a 400 mM, přičemž byly vždy aplikovány 3 ml pufru o příslušné koncentraci imidazolu a eluovaný protein byl jímán po frakcích o objemu 1,5 ml. Z důvodu kontroly čistoty a množství proteinu na SDS-PAGE bylo z frakcí vždy odebráno 15  $\mu$ l, které byly smíchány s 5  $\mu$ l vzorkového pufru, 5 minut zahřívány při teplotě 95 °C, následně centrifugovány a nanášeny do jamek (obrázek 4.6, str. 64).





**Obrázek 4.6** Polyakrylamidový gel (12 %) obarvený Coomassie brilliant blue R 250 získaný po SDS-PAGE se vzorky z niklové chelatační chromatografie po expresi ASK1-CRR-CD. Do 1. jamky označené jako „std“ byly naneseny 3  $\mu$ l standardu „Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color“, dále do 2. jamky označené „P“ bylo naneseno 15  $\mu$ l zředěné pelety po centrifugaci sonikátu smíchaného s 5  $\mu$ l vzorkového pufru, do 3. jamky označené „S“ bylo naneseno 15  $\mu$ l zředěného supernatantu po centrifugaci sonikátu smíchaného s 5  $\mu$ l vzorkového pufru a do zbylých jamek bylo nanášeno vždy 15  $\mu$ l z elučních frakcí smíchaných opět s 5  $\mu$ l vzorkového pufru. Eluční frakce jsou na obrázku označeny 1-7: 1 – 100 mM imidazol, 2 – 100 mM imidazol, 3 – 150 mM imidazol, 4 – 150 mM imidazol, 5 – 200 mM imidazol, 6 – 300 mM imidazol, 7 – 400 mM imidazol. SDS PAGE probíhala 1 hodinu při napětí 200 V.

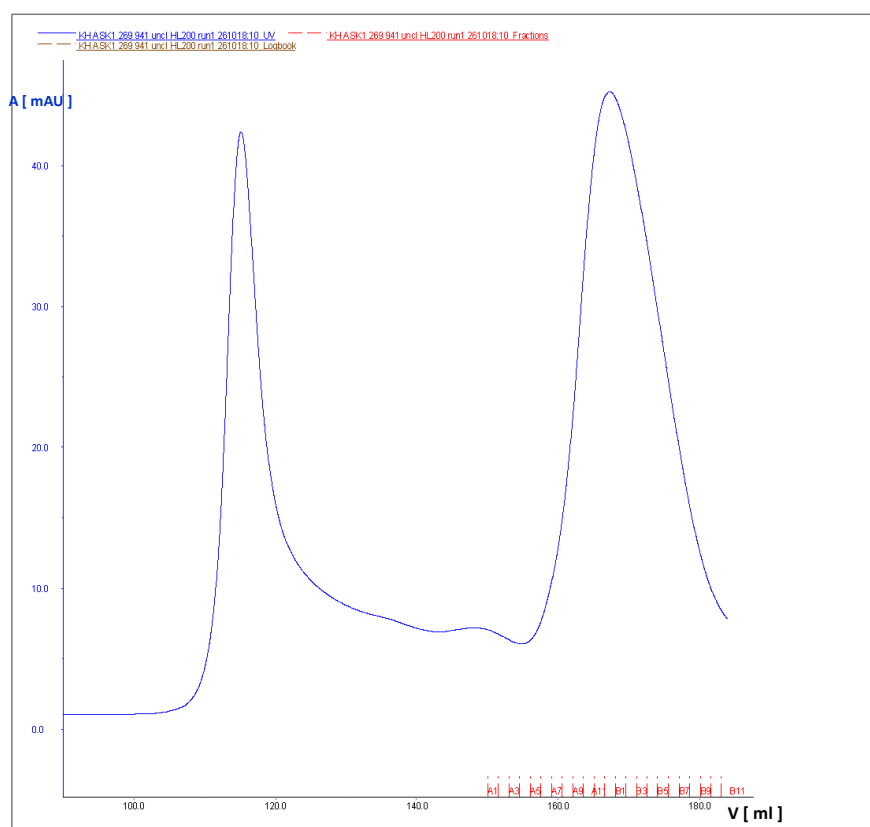
Po zkontrolování čistoty a množství na SDS-PAGE byly všechny frakce po niklové chelatační chromatografii sloučeny a dialyzovány za mírného míchání po dobu 2 hodin proti dialyzačnímu pufru pro rychlé snížení koncentrace imidazolu, který má nepříznivý vliv na stabilitu proteinu ASK1-CRR-CD. Po dialýze bylo třeba zredukovat objem roztoku proteinu do té míry, aby jej bylo možné nanést na purifikační kolonu, přičemž nástřiková smyčka měla objem 2 ml. Vzhledem k náchylnosti proteinu ASK1-CRR-CD v této fázi purifikace k agregaci při vyšších koncentracích byl objem roztoku proteinu redukován vždy jen na dvojnásobný objem a purifikační krok s gelovou permeační chromatografií byl opakován.



### 4.3.2 Gelová permeační chromatografie

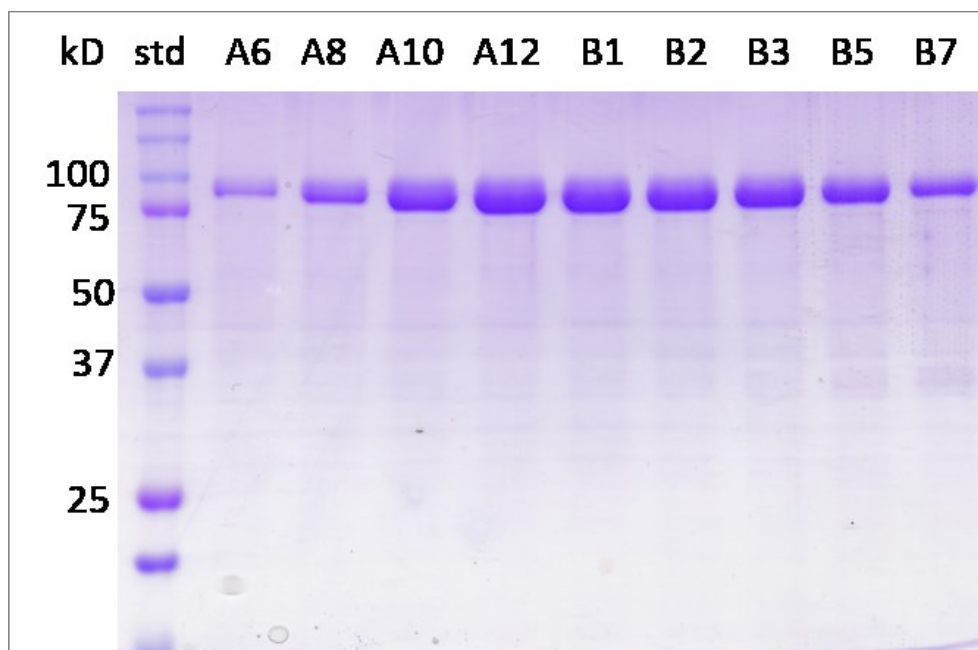
Pro purifikaci proteinu ASK1-CRR-CD metodou gelové permeační chromatografie byla využívána kolona Superdex 200 26/600. Na kolonu byl vždy proveden nástřik 2 ml vzorku proteinu, který byl následně podroben separaci na koloně při průtoku 2 ml/min. Eluovány byly 1,5 ml frakce, ze kterých bylo vždy odebráno 15  $\mu$ l vzorku, který byl smíchán s 5  $\mu$ l vzorkového pufru, tato směs byla zahřívána po dobu 5 minut při 95 °C, krátce centrifugována a nanesena do jamek pro kontrolu množství a čistoty na SDS-PAGE.

Na chromatogramu zobrazeném na obrázku 4.7 můžeme pozorovat 2 píky. První pík se vyskytuje na tzv. mrtvém objemu kolony, kde dochází k eluci částic větších, než je separační schopnost kolony – povětšinou se jedná o agregované proteiny. Druhý pík odpovídá cílovému proteinu, tedy ASK1-CRR-CD.



**Obrázek 4.7** Chromatogram zobrazující průběh gelové permeační chromatografie proteinu ASK1-CRR-CD. Modrá křivka znázorňuje závislost absorbance při 280 nm na elučním objemu. Červeně jsou označeny pozice jímáných frakcí.

Množství a čistota frakcí po gelové permeační chromatografii je doložena na obrázku 4.8, kde je vizualizován akrylamidový gel po SDS-PAGE.



**Obrázek 4.8** Polyakrylamidový gel (12 %) obarvený Coomassie brilliant blue R 250 získaný po SDS-PAGE se vzorky z gelové permeační chromatografie při purifikaci ASK1-CRR-CD. Do 1. jamky označené jako „std“ byly nanášeny 3  $\mu$ l standardu „Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color“, do dalších jamek bylo nanášeno vždy 15  $\mu$ l z příslušných elučních frakcí smíchaných s 5  $\mu$ l vzorkového pufru. SDS-PAGE probíhala 1 hodinu při napětí 200 V.

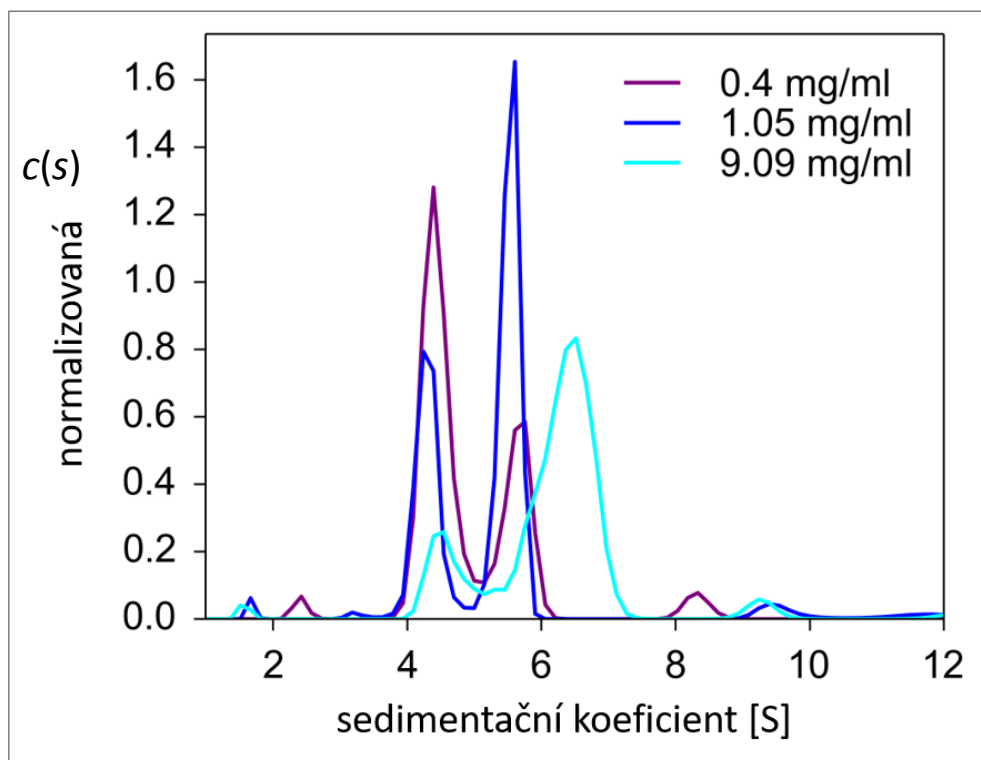
Po gelové permeační chromatografii byly všechny frakce v rozsahu pipetovaném na polyakrylamidové gely sloučeny, pro další účely byl zredukován jejich objem, ve kterém byla změřena koncentrace na přístroji Nanodrop a takto připravený protein byl následně zamražen a skladován při teplotě  $-80^{\circ}\text{C}$ . Při purifikaci proteinu ASK1-CRR-CD ze 4 l LB média bylo většinou dosaženo výtěžku pohybujícího se kolem 4 mg čistého proteinu.

#### 4.4 Analýza oligomerního chování ASK1-CRR-CD metodou sedimentační rychlosti

V okamžiku, kdy bylo možné připravit ASK1-CRR-CD v dostatečném množství a čistotě, nás v první řadě zajímal oligomerní stav tohoto proteinu, neboť oligomerizace je jedním z předpokladů, na kterém je založen současný model regulace aktivity této

proteinkinasy. Pro charakterizaci oligomerního stavu proteinu ASK1-CRR-CD byla využita analytická centrifugace, konkrétně metoda sedimentační rychlosti. Měření bylo provedeno na analytické ultracentrifuze ProteomLab<sup>TM</sup> XL-I (Beckman Coulter, USA).

Byly analyzovány vzorky ASK1-CRR-CD o třech různých koncentracích za využití absorpční a interferenční optiky. Na obrázku 4.9 je zobrazena distribuce sedimentačních koeficientů  $c(s)$  normalizovaná na plochu pod křivkou získaná za využití interferenční optiky – využívá se zde tedy různých indexů lomu charakterizujících různá prostředí.



**Obrázek 4.9** Závislost normalizované distribuce sedimentačních koeficientů  $c(s)$  na sedimentačním koeficientu  $s$  získaná z metody sedimentační rychlosti analytické ultracentrifugace. Fialová křivka znázorňuje distribuci sedimentačních koeficientů pro ASK1-CRR-CD o koncentraci 0,4 mg/ml, modrá křivka představuje ASK1-CRR-CD o koncentraci 1,05 mg/ml a tyrkysová křivka ASK1-CRR-CD o koncentraci 9,09 mg/ml.

Na obrázku si můžeme všimnout, že pro všechny tři měřené koncentrace v grafu pozorujeme dva píky, což naznačuje přítomnost více oligomerních stavů. V případě nejnižší koncentrace jasně dominuje pík v oblasti sedimentačního koeficientu zhruba 4,5 S odpovídající sedimentačnímu koeficientu monomerní formy proteinu ASK1-CRR-CD, v případě vyšších koncentrací dochází k posunu k vyšším hodnotám sedimentačních koeficientů, což

dokumentuje vznik dimerní formy. Analýza oligomerního stavu ASK1-CRR-CD metodou sedimentační rychlosti ukázala na koncentračně závislou dimerizaci tohoto proteinu a existenci rovnováhy monomer-dimer v roztoku. Získání a zpracování dat bylo realizováno ve spolupráci s RNDr. Olívií Petrvalskou, Ph.D..

#### **4.5 Analýza ASK1-CRR-CD metodou SAXS**

Po získání výsledků analýzy oligomerního chování proteinu ASK1-CRR-CD pomocí analytické centrifugace byla dalším krokem analýza pomocí SAXS – metody, umožňující charakterizaci proteinu v roztoku a poskytující informaci o velikosti, či tvaru molekul v širokém rozsahu molekulových vah. Veškerá synchrotronová SAXS data prezentována v této práci byla získána na pracovišti P12 spravovaném Evropskou laboratoří pro molekulární biologii na okruhu Petra III (DESY, Hamburg, Německo).

Jak bylo popsáno v kap. 3.5.2, SAXS data byla získána za využití dvou různých přístupů. Prvním z nich byl SAXS na vzorcích ASK1-CRR-CD připravených v koncentračním rozpětí 0,44 mg/ml – 5,86 mg/ml. Rozptylové křivky získané z výše jmenovaných měření byly dále analyzovány za využití programu PRIMUS [57], čímž byly získány parametry uvedené v tabulce 4.2 (str. 69). V tabulce je možné pozorovat zvyšující se hodnoty jednotlivých analyzovaných parametrů pro zvyšující se koncentraci proteinu, což je ve shodě s koncentračně závislou dimerizací ASK1-CRR-CD pozorovanou při analytické ultracentrifugaci. Podíl na zvyšujících se hodnotách těchto parametrů však může mít i stav proteinu. V případě, že je vzorek agregovaný, může totiž docházet k umělému navyšování těchto hodnot. V posledním řádku tabulky 4.2 (str. 69) jsou parametry získané z uspořádání SEC-SAXS, které jsou (založeno na odhadu molekulové hmotnosti) nejbližší monomernímu proteinu ASK1-CRR-CD a z toho důvodu byla data získaná touto cestou dále využívána pro modelování monomeru.

Druhým přístupem bylo uspořádání SEC-SAXS. Chromatogram zobrazující průběh gelové permeační chromatografie na koloně Superdex 200 Increase 10/300 je na obrázku 4.10 (str. 69).

**Tabulka 4.2** Strukturní parametry získané z dat SAXS.

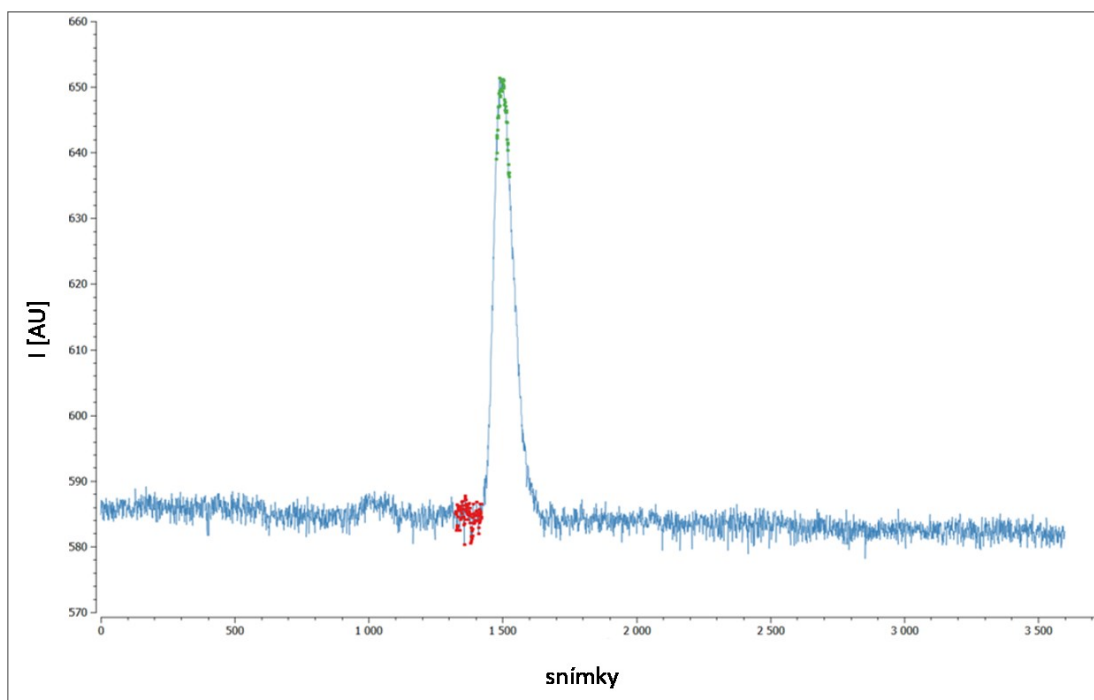
Vzorek	c [mg/ml]	$R_g^a$ [nm] z Guiniera	$R_g^b$ [nm] z P(r)	$D_{max}^c$ [nm] z P(r)	$V_p^d$ [nm <sup>3</sup> ]	$M_w^e$ [kD]
BSA	4,20	$2,89 \pm 0,29$	$2,93 \pm 0,01$	9,80	111	~ 69
BSA	4,20	$2,91 \pm 0,50$	$2,93 \pm 0,01$	9,96	110	~ 69
ASK1-CRR-CD	0,44	$5,07 \pm 0,07$	$5,09 \pm 0,05$	17,20	236	~ 148
ASK1-CRR-CD	0,76	$5,19 \pm 0,07$	$5,13 \pm 0,03$	16,08	240	~ 150
ASK1-CRR-CD	0,98	$5,32 \pm 0,04$	$5,39 \pm 0,03$	17,50	252	~ 157
ASK1-CRR-CD	1,93	$5,87 \pm 1,50$	$5,91 \pm 0,02$	19,68	304	~ 190
ASK1-CRR-CD	2,92	$5,91 \pm 0,53$	$6,10 \pm 0,02$	21,02	340	~ 213
ASK1-CRR-CD	5,86	$7,52 \pm 0,51$	$8,13 \pm 0,06$	37,60	414	~ 259
ASK1-CRR-CD		$4,12 \pm 0,04$	$4,24 \pm 0,04$	14,00	150	~ 94

a Vypočítáno za využití Guinierovy aproximace.

b, c Vypočítáno za využití párové distribuční funkce.

d Porodův objem.

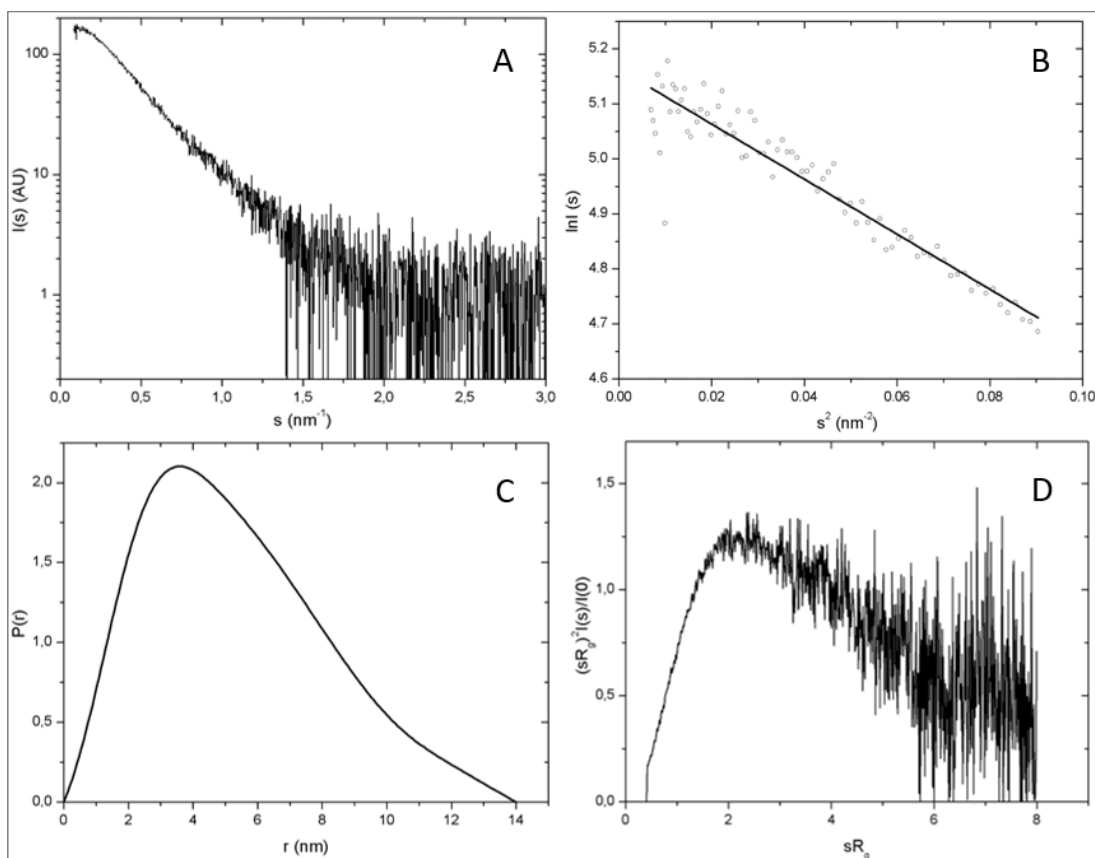
e Molekulová hmotnost vypočítaná na základě Porodova objemu. Teoretická molekulová hmotnost je pro BSA 72 kD a pro ASK1-CRR-CD 86,6 kD.



**Obrázek 4.10** Chromatogram zobrazující průběh gelové permeační chromatografie předcházející SAXS. Zeleně a červeně jsou zobrazeny oblasti píku a pufru, které byly použity pro výpočet rozptylové křivky.

Chromatografický záznam byl následně převeden na rozptylovou křivku, tedy závislost intenzity rozptýleného záření  $I(s)$  na rozptylovém vektoru  $s$ , za využití programu

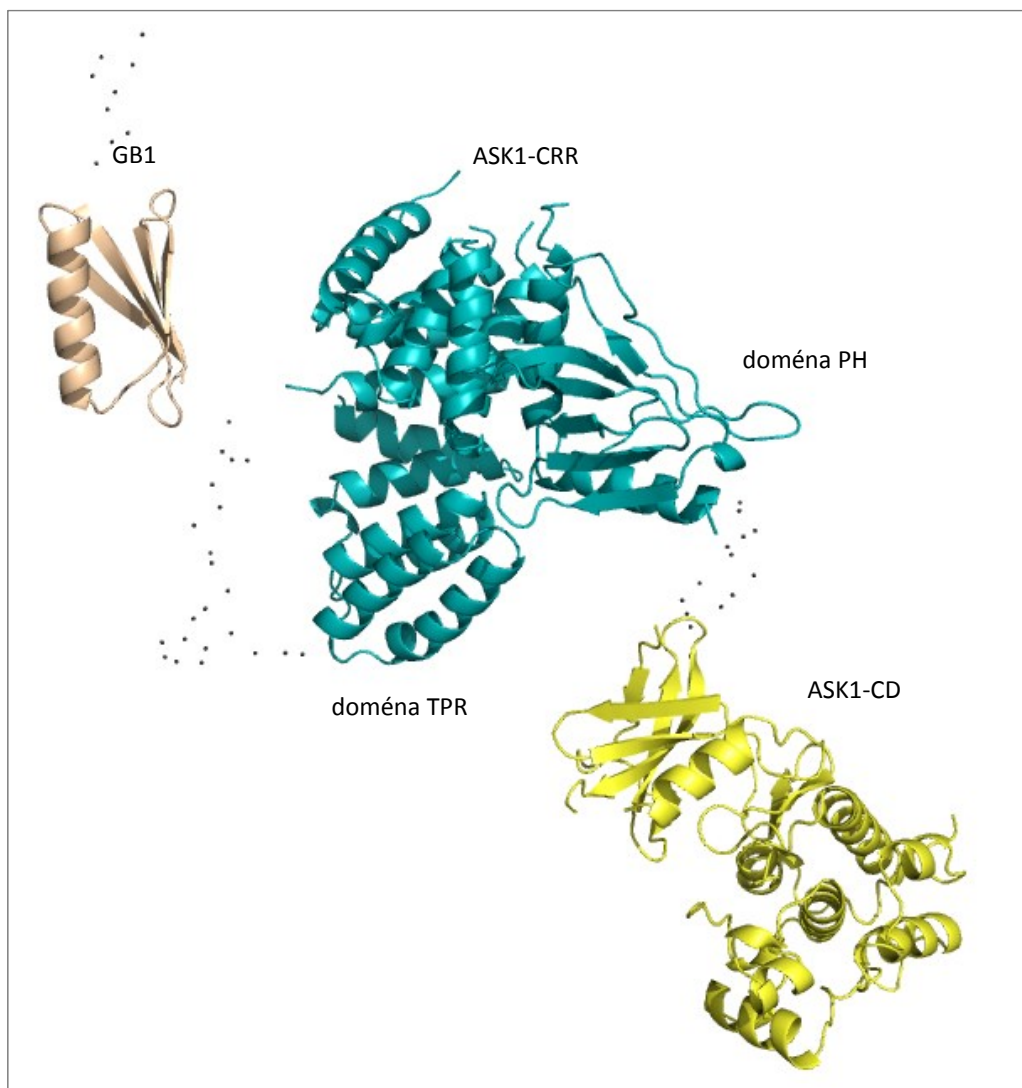
Chromixs [58]. Rozptylová křivka je znázorněna na obrázku 4.11, ve kterém je dále zobrazen také Guinierův výnos, Kratkyho bezrozměrný výnos a distribuce vzdáleností.



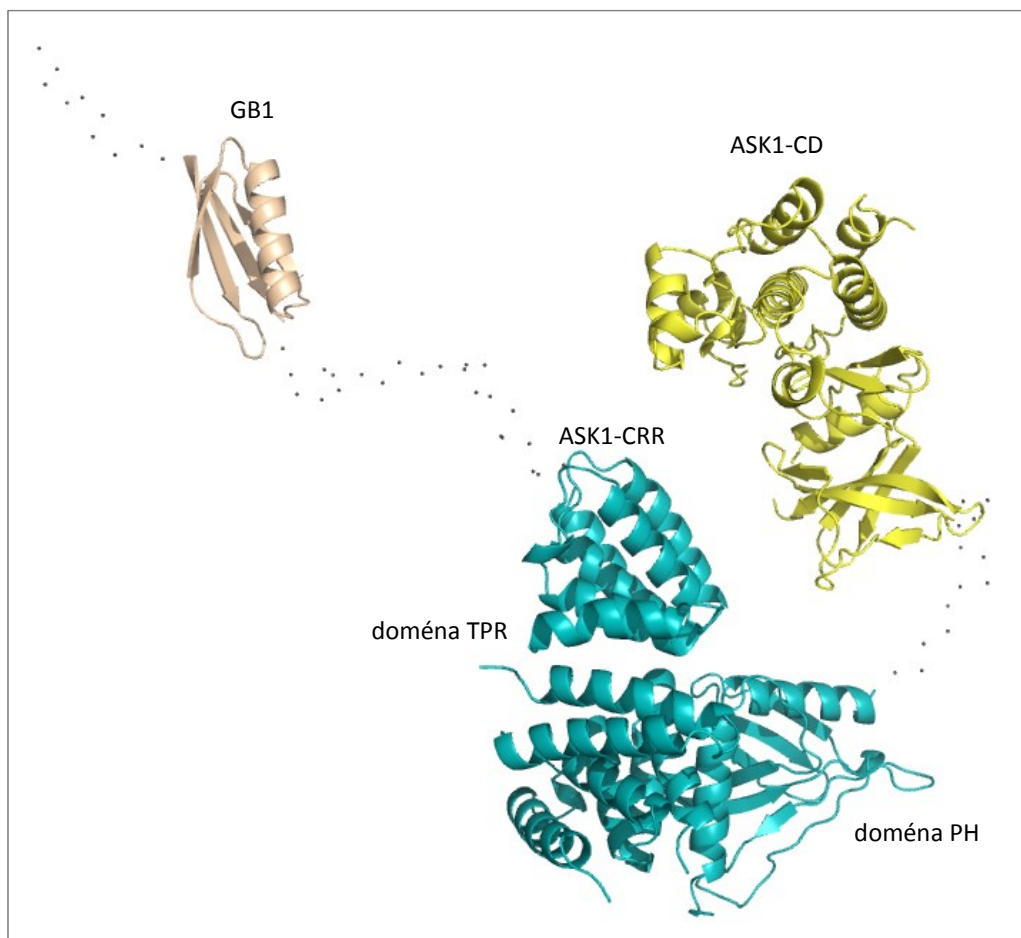
**Obrázek 4.11** Data ze SAXS pro monomer ASK1-CRR-CD. A – Intenzita rozptýleného záření jako funkce rozptylového vektoru  $s$  ( $s=4\pi\sin(\theta)/\lambda$ , kde  $2\theta$  je rozptylový úhel a  $\lambda$  vlnová délka), B – Guinierův výnos, jehož linearita poukazuje na dobrou kvalitu vzorku, C – párová distribuční funkce s maximální vzdáleností v rámci molekuly 14 nm, D – bezrozměrný Kratkyho výnos. Maximum v hodnotě 1,104 pro  $sR_g=1,73$  je typické pro kompaktní globulární proteiny. V případě tohoto proteinu je maximum posunuto k vyšším hodnotám, což je charakteristické pro flexibilní proteiny.

## 4.6 Modelování monomeru ASK1-CRR-CD

Na základě dat získaných metodou SAXS bylo za využití programu CORAL vypočítáno 40 strukturních modelů pro monomer proteinu ASK1-CRR-CD. Poté byla provedena shluková analýza v programu UCSF Chimera [52], která vypočítané modely rozdělila na základě vzájemné podobnosti do 10 skupin. Z těchto skupin byly vybrány dvě nejpočetnější obsahující 11, respektive 8 modelů. Níže jsou uvedeny reprezentativní modely pro každou z těchto dvou nejvíce populovaných skupin (obr. 4.12 na str. 71 a obr. 4.13 na str. 72).



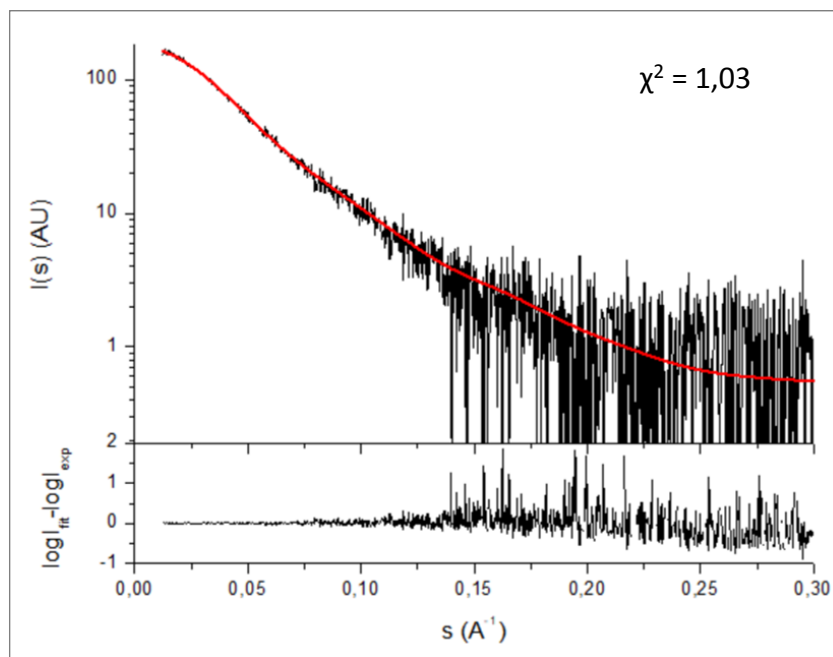
**Obrázek 4.12** Reprezentativní model monomeru ASK1-CRR-CD nejvíce populované skupiny. Protein GB1 je na obrázku znázorněn světle hnědou barvou, ASK1-CRR je znázorněna modře a ASK1-CD žlutě.



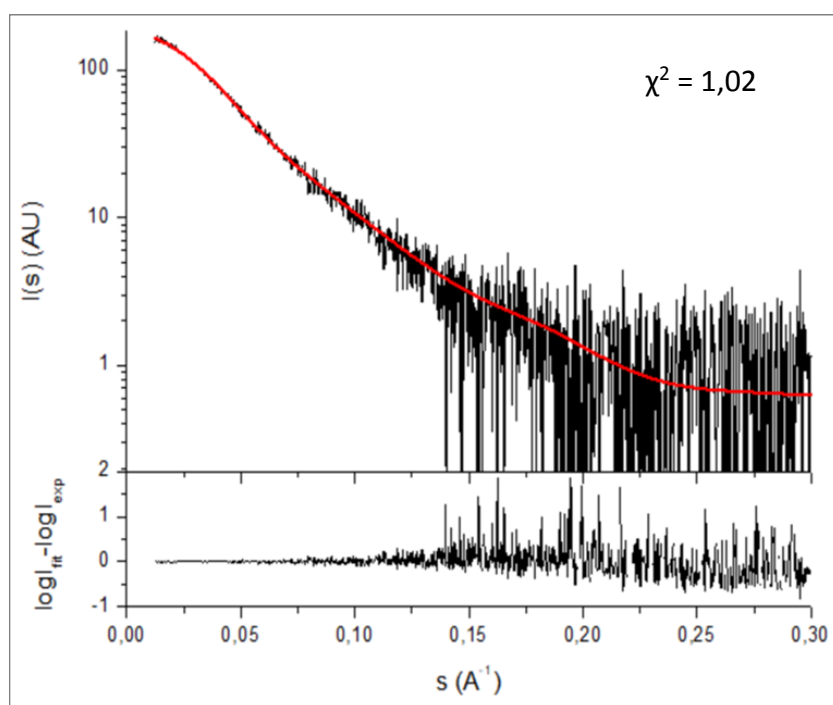
**Obrázek 4.13** Reprezentativní model monomeru *ASK1-CRR-CD* druhé nejvíce populované skupiny. Protein *GB1* je na obrázku znázorněn světle hnědou barvou, *ASK1-CRR* je znázorněna modře a *ASK1-CD* žlutě.

Pro strukturní modely monomerů uvedené na obrázcích byly vyneseny závislosti intenzity  $I(s)$  na rozptylovém vektoru  $s$ , které jsou porovnány s experimentálními daty (viz obr. 4.14 na str. 73 a obr. 4.15 na str. 73). Je patrné, že v obou případech teoretické rozptylové křivky vypočítané z modelů dobře odpovídají experimentálním SAXS datům.





**Obrázek 4.14** Porovnání rozptylové křivky vypočítané na základě reprezentativního modelu monomeru ASK1-CRR-CD z nejvíce populované skupiny modelů (červená křivka) s experimentálními daty získanými ze SAXS (černá křivka).



**Obrázek 4.15** Porovnání rozptylové křivky vypočítané na základě reprezentativního modelu monomeru ASK1-CRR-CD z nejvíce populované skupiny modelů (červená křivka) s experimentálními daty získanými ze SAXS (černá křivka).

Pro další validaci modelů byl využit program Winhydropro [59], který na základě struktur umožňuje výpočet hydrodynamických vlastností makromolekul. Parametry získané na základě tohoto programu pro oba modely jsou uvedeny v tabulce 4.3.

**Tabulka 4.3** *Hydrodynamické parametry pro modely ASK1-CRR-CD získané za využití programu Winhydropro*

Model	R <sub>g</sub> [nm]	s [S]	D <sub>max</sub> [nm]
monomer 1	4,09	4,64	15,6
monomer 2	4,00	4,49	16,8

Získané hodnoty pro gyrační poloměr  $R_g$  a maximální vzdálenost v rámci molekuly  $D_{max}$  jsou v dobré shodě s hodnotami těchto parametrů získanými z analýzy SAXS dat (tab. 4.2, str. 69). Hodnota sedimentačního koeficientu se také dobře shoduje s hodnotou pozorovanou při AUC za využití metody sedimentační rychlosti (obr. 4.9, str. 67). Přestože zde máme dva strukturní modely pro monomer ASK1-CRR-CD, které jsou od sebe na první pohled poměrně odlišné, jsou oba konzistentní s pozorovanými SAXS daty i s výsledky AUC metody sedimentační rychlosti. To naznačuje značnou konformační heterogenitu studovaného proteinu.

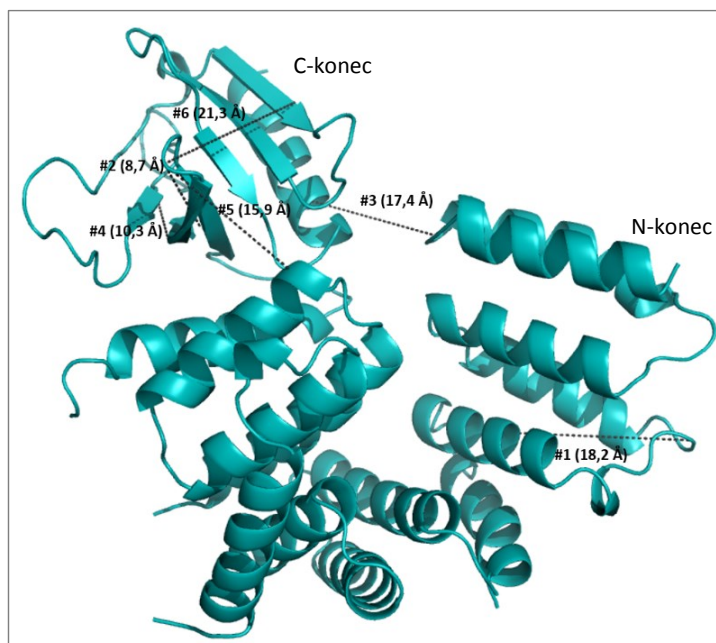
## 4.7 Chemické zesítení spojené s hmotnostní spektrometrií

Chemickým zesítením za využití DSG jako síťovacího činidla spojeným s hmotnostní spektrometrií byla identifikována spojení uvedená v tabulce 4.4.

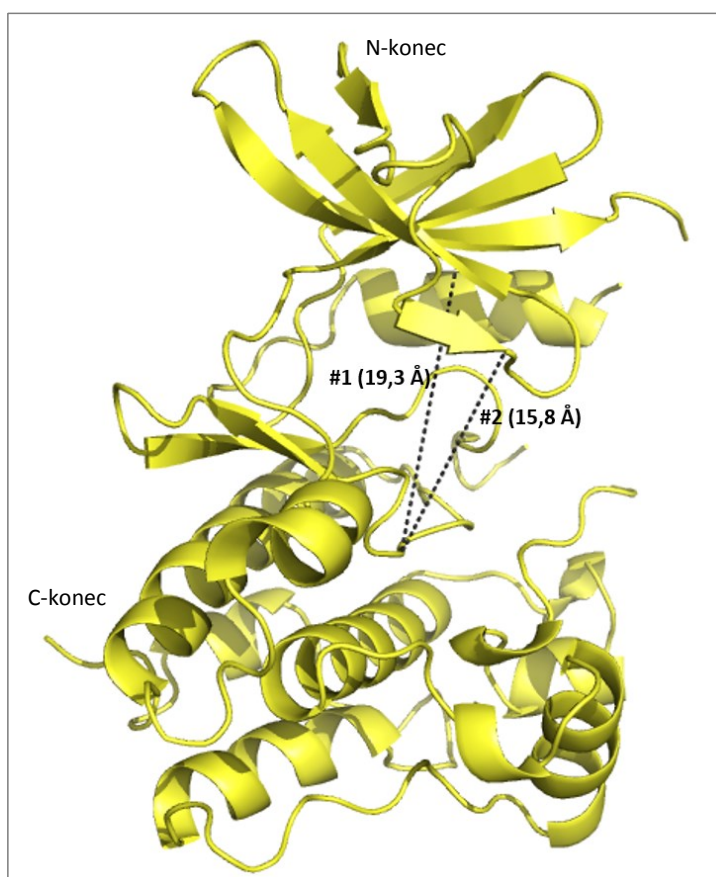
*Tabulka 4.4 Spojení nalezená pro ASK1-CRR-CD za využití DSG.*

Spojení č.	Zesítené peptidy		Zesítená rezidua		m/z (exp.)	chyba (ppm)
	ASK1-CRR	ASK1-CRR	ASK1-CRR	ASK1-CRR		
1	353-361	340-352	Y355	T342	2735,3849	0,30
2	559-568	569-584	T567	Y570	3177,6609	0,11
3	285-298	645-657	T288	K645	3275,6508	0,11
4	585-597	569-584	S587	S573	3572,8157	0,07
5	501-505	559-584	K503	T567	3807,0881	0,27
6	611-620	559-584	S613	T567	4310,2488	0,15
	<b>ASK1-CD</b>	<b>ASK1-CD</b>	<b>ASK1-CD</b>	<b>ASK1-CD</b>		
1	706-714	803-819	K709	K805	3012,6615	0,03
2	684-698	803-819	K688	K805	3496,9049	0,04
	<b>ASK1-CRR</b>	<b>ASK1-CD</b>	<b>ASK1-CRR</b>	<b>ASK1-CD</b>		
1	646-657	706-714	T652	K709	2571,3401	1,03
2	611-620	684-698	S613	K688	2799,5052	0,44
3	559-584	768-774	T567	S768	3974,1197	0,12
4	559-584	684-698	T567	K688	4711,5295	0,46
5	559-584	768-785	T567	T784	5270,7189	0,03

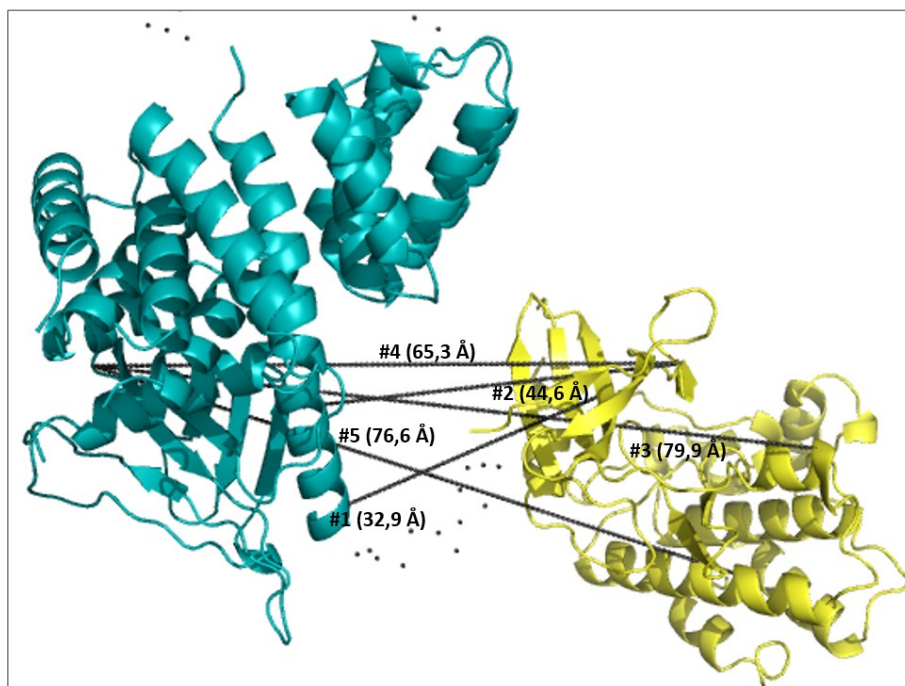
Spojení v rámci samotných domén ASK1-CRR (obr. 4.16, str. 76) a ASK1-CD (obr. 4.17 na str. 76) splňují vzdálenostní omezení určená délkou raménka síťovacího činidla (7,7 Å). Spojení nalezená mezi těmito dvěma doménami však nejsou konzistentní s žádným z vypočítaných modelů monomerů, protože nejsou splněna vzdálenostní omezení a často také dochází ke kolizi spojení se samotnou strukturou (obr. 4.18, str. 77). Požadavky na vzdálenost nejsou splněny za předpokladu, že uvažujeme intramolekulární spojení. Je však možné, že ve skutečnosti pozorujeme intermolekulární spojení mezi dvěma molekulami ASK1-CRR-CD v rámci dimeru, jehož model ovšem nemáme k dispozici.



**Obrázek 4.16** Spojení nalezená v rámci ASK1-CRR. Očíslováno podle tabulky 4.4 na straně 75.



**Obrázek 4.17** Spojení nalezená v rámci ASK1-CD. Očíslováno podle tabulky 4.4 na straně 75.



**Obrázek 4.18** Spojení nalezená mezi doménami ASK1-CRR a ASK1-CD. Zobrazeno pro reprezentativní model z nejvíce populované skupiny získaného na základě programu UCSF Chimera [52].

## 5. Diskuze

Proteinkinasa ASK1 je apikální kinasa MAPK kaskády, jejíž aktivita závisí na vlivech okolního prostředí. Podílí se na přenosu signálu v buňce, a to především v reakci na různé druhy stresu. Je aktivována např. v důsledku přítomnosti reaktivních forem kyslíku, cytokinů, stresu endoplazmatického retikula nebo osmotického stresu. V případě, že je ASK1 aktivována, dochází k aktivaci dalších proteinkinás MAPK signalizační kaskády vedoucí v konečném důsledku k zánětu nebo smrti buňky. Poruchy v regulaci ASK1 jsou spojeny se vznikem neurodegenerativních, kardiovaskulárních, nádorových nebo jiných závažných onemocnění a z toho důvodu je aktivita ASK1 v buňce přísně regulována. K regulaci aktivity ASK1 dochází prostřednictvím protein-proteinových interakcí a oligomerizace. Doposud není známo, jakým molekulárním mechanismem tyto děje probíhají, což nás vedlo ke studiu tohoto proteinu.

Pro lepší pochopení mechanismu regulace ASK1 by bylo vhodné studovat tento protein v co nejkompletnější formě (zahrnující všechny funkční domény) a zároveň v komplexu se svými interakčními partnery. Protein v takové formě se bohužel zatím v dostatečném množství v bakteriálním systému nepodařilo připravit. Tato diplomová práce se zabývá charakterizací zkrácené verze proteinu ASK1 zahrnující centrální regulační oblast (ASK1-CRR) a katalytickou doménu (ASK1-CD). Struktury obou těchto domén samostatně již byly vyřešeny za využití rentgenové krystalografie, nicméně jejich vzájemná orientace a přesná role v regulaci ASK1 není jasná. Obecně přijímaný model regulace ASK1 je založen mimo jiné na oligomerizaci. Studie Bunkocziho a kolektivu z roku 2007 [21], jejíž součástí bylo i vyřešení struktury katalytické domény ASK1 ukázala, že tato doména tvoří pevné dimery. Naopak, studie Weijmana a kolektivu z roku 2017 [20], v rámci které byla vyřešena struktura centrální regulační oblasti, ukázala, že ASK1 obsahující kromě katalytické domény i centrální regulační oblast a doménu vázající thioredoxin, je podle dat získaných malouhlovým rozptylem rentgenového záření čistý monomer, čímž vnesla do modelu regulace rozpor.

Prvním krokem této práce bylo připravit množství proteinu ASK1-CRR-CD postačující pro plánované biofyzikální experimenty. Vzhledem k tomu, že se v naší laboratoři tato varianta proteinu do té doby nepřipravovala, bylo třeba vyvinout podmínky exprese a purifikační protokol. Poté, co bylo dosaženo řádově miligramových výtěžků proteinu

ASK1-CRR-CD, bylo přistoupeno k analýze oligomerního stavu pomocí analytické centrifugace metodou sedimentační rychlosti. Bylo zjištěno, že v oblasti studovaných koncentrací, tzn. v mikromolárním rozsahu, se protein vyskytuje v rovnováze monomer-dimer.

Dalším bodem této práce byla analýza proteinu ASK1-CRR-CD za využití maloúhlového rozptylu rentgenového záření. Zde se ukázalo jako velmi užitečné podrobit měření vzorky připravené dvěma způsoby. Při prvním přístupu byla připravena koncentrační řada proteinu a tyto vzorky byly následně změřeny klasickým vsádkovým způsobem. Parametry vypočítané z těchto dat reflektovaly nárůst podílu dimeru se zvyšující se koncentrací, pravděpodobně také odrážejí atraktivní interakce mezi molekulami proteinu. Při druhém přístupu předcházela samotnému měření gelová permeační chromatografie, což mělo za následek zředění proteinu na velmi nízké koncentrace a odstranění agregátů. Zpracováním dat byly získány parametry charakterizující monomer ASK1-CRR-CD. Tato skutečnost může vysvětlit, proč Weijman a kolektiv [20] pozorovali pro protein obsahující ASK1-TBD, ASK1-CRR a ASK1-CD při stejném uspořádání (SEC-SAXS) čistě monomerní částice. Není tedy vyloučeno, že i protein ASK1 studovaný v práci Weijmana a kolektivu [20] (ASK1-TBD-CRR-CD) dimerizuje. Koncentrace proteinu ASK1 má pravděpodobně významný vliv na jeho oligomerní stav. Otázkou zůstává, v jaké podobě se ASK1 nachází uvnitř samotných buněk. Vzhledem k tomu, že se jedná o signální kinasu, nelze očekávat intracelulární koncentrace vyšší než nanomolární. Na druhou stranu zde mohou hrát významnou úlohu interakční partneři ASK1, která je součástí multiproteinového komplexu, tzv. ASK1-signalosomu. Proteinová lešení (v tomto případě např. proteiny 14-3-3) mohou zvýšit lokální koncentraci proteinu do té míry, že dojde k oligomerizaci. Kromě toho se na dimerizaci podílí C-terminální „coiled-coil“ motiv.

Data získaná přístupem SEC-SAXS byla využita pro modelování struktury monomeru za využití programu CORAL [49] založeném na tzv. modelování „rigid-body“. Bylo vypočítáno 40 strukturních modelů monomerů, jejichž shoda s experimentálními daty udaná hodnotou  $\chi^2$  byla velmi dobrá. Kromě toho, hydrodynamické parametry, spočítané pro modely za využití programu Winhydropro [57], odpovídaly parametrům získaným prostřednictvím technik SAXS a AUC (tab. 4.2 na str. 69, obr. 4.9 na str. 67). Přestože jsou všechny modely podle dostupných parametrů v dobré shodě s experimentálními daty, jedná se o poměrně nesourodou skupinu modelů, na kterou pokud aplikujeme program UCSF

Chimera [50], dostaneme 10 skupin konformačně si podobných modelů. To naznačuje, že protein ASK1-CRR-CD je flexibilní a v roztoku zaujímá různá konformační uspořádání.

Chemické zesílení, které bylo provedeno pomocí síťovacího činidla DSG pro zhodnocení kvality modelů ukázalo, že vzniklá spojení v rámci jednotlivých domén splňují vzdálenostní omezení vyplývající z jejich 3D struktur. Na druhou stranu u spojení nalezených mezi oběma doménami nesplňuje tato vzdálenostní omezení ani jeden z modelů, které máme k dispozici. Vystává zde tedy možnost, že se jedná o intermolekulární spojení propojující rezidua mezi dvěma molekulami v rámci dimeru, pro který však zatím nemáme strukturní model. Pro lepší pochopení výsledků chemického zesílení spojeného s hmotnostní spektrometrií, konkrétně pro zjištění, zda jsou nalezená spojení intra- nebo intermolekulární, by bylo výhodné připravit vzorek proteinu značený dusíkem  $^{15}\text{N}$ . Na přípravě tohoto proteinu se pracuje.

Tato diplomová práce ukázala, že protein ASK1-CRR-CD je s rostoucí koncentrací schopen vytvářet dimery, což je konzistentní s obecně přijímaným modelem aktivace proteinu ASK1. Rozpor, který byl do modelu regulace vnesen nedávnou studií Weijmana a kol. [20], byl patrně způsoben velkým zředěním, ke kterému dochází při měření proteinů přístupem SEC-SAXS znemožňujícím detekci dimerizace s  $K_D$  v mikromolární oblasti. Stále zde však zůstávají nezodpovězené otázky ohledně toho, zda je dimerizační rozhraní tvořeno pouze katalytickou doménou, nebo zda se na dimerizaci aktivně podílí i centrální regulační oblast. Kromě toho není jasné, jakou úlohu v dimerizaci hraje doména vázající thioredoxin. Odpovědi na tyto i další otázky, doufejme, přinesou další, ať už probíhající, nebo plánované, experimenty.



## 6. Závěr

- Byl připraven plasmid pRSFDuet-1 pro expresi proteinu ASK1-CRR-CD.
- Byly optimalizovány podmínky exprese proteinu ASK1-CRR-CD.
- Podařilo se optimalizovat purifikační protokol pro přípravu proteinu ASK1-CRR-CD v řádu jednotek miligramů.
- Byla provedena analytická ultracentrifugace metodou sedimentační rychlosti, která indikovala koncentračně dependentní dimerizaci proteinu ASK1-CRR-CD.
- Byl proveden malouhlový rozptyl rentgenového záření, který potvrdil dimerizaci proteinu ASK1-CRR-CD a na jehož základě byly prostřednictvím programu CORAL vypočítány strukturní modely monomeru proteinu ASK1-CRR-CD.
- Za využití programu Winhydropro a chemického zesílení spojeného s hmotnostní spektrometrií byla posouzena kvalita vypočítaných strukturních modelů monomeru ASK1-CRR-CD.

## Zdroje

- [1] Alberts, B., Bray, D., Johnson, A., Lewis, J. a kol.: Základy buněčné biologie. Espero Publishing, Ústí nad Labem (1998)
- [2] <https://www.cellsignal.com/contents/science/protein-kinases-introduction/kinases>, 27.3.2019
- [3] Kodíček, M., Valentová, O., Hynek, R.: Biochemie. Chemický pohled na biologický svět, 2. přepracované vydání. VŠCHT, Praha (2018)
- [4] Edelman, A.M., Blumenthal, D.K., Krebs, E.G.: Protein serine/threonine kinases. *Ann Rev Biochem.* 1987, 56, 567-613
- [5] <http://www.scq.ubc.ca/protein-phosphorylation-a-global-regulator-of-cellular-activity>, 27.3.2019
- [6] Nishida, T., Hattori, K., Watanabe, K.: The regulatory and signaling mechanisms of the ASK family. *Adv Biol Regul.* 2017, 66, 2-22
- [7] Matsuzawa, A., Ichijo, H.: Stress-responsive protein kinases in redox-regulated apoptosis signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2005, 7, 472-481
- [8] Widmann, C., Gibson, S., Jarpe M.B., Johnson, G.L.: Mitogen-activated protein kinase: conservation of a three-kinase module from yeast to human. *Physiol Rev.* 1999, 79, 143-180
- [9] Darling, N.J., Cook, S.J.: The role of MAPK signalling pathways in the response to endoplasmic reticulum stress. *Biochim Biophys Acta.* 2014, 1843, 2150-2163
- [10] Ichijo, H., Nishida, E., Irie, K., Dijke, P.T., Saitoh, M., Moriguchi, T., Takagi, M., Matsumoto, K., Miyazono, K., Gotoh, Y.: Induction of apoptosis by ASK1, a mammalian MAPKKK that activates SAPK/JNK and p38 signaling pathways. *Science.* 1997, 275, 90-94
- [11] Fujino, G., Noguchi, T., Matsuzawa, A., Yamauchi, S., Saitoh, M., Takeda, K., Ichijo, H.: Thioredoxin and TRAF family proteins regulate reactive oxygen species-dependent activation of ASK1 through reciprocal modulation of the N-terminal homophilic interaction of ASK1. *Mol Cell Biol.* 2007, 27, 8152-8163

- [12] Okazaki, T.: ASK family in infection and inflammatory disease. *Adv Biol Regul.* 2017, 66, 37-45
- [13] Matsuzawa, A.: Physiological roles of ASK family members in innate immunity and their involvement in pathogenesis of immune diseases. *Adv Biol Regul.* 2017, 66, 46-53
- [14] Liu, T., Zhou, H.J., Min, W.: ASK family in cardiovascular biology and medicine. *Adv Biol Regul.* 2017, 66, 54-62
- [15] Guo, X., Namekata, K., Kimura, A., Harada, C.: ASK1 in neurodegeneration. *Adv Biol Regul.* 2017, 66, 63-71
- [16] Rusnak, L., Fu, H.: Regulation of ASK1 signaling by scaffold and adaptor proteins. *Adv Biol Regul.* 2017, 66, 23-30
- [17] Hattori, K., Naguro, I., Runchel, Ch., Ichijo, H.: The roles of ASK family proteins in stress responses and diseases. *Cell Commun Signal.* 2009, 7
- [18] <https://www.uniprot.org/uniprot/Q99683>, 27.3.2019
- [19] Obsil, T., Obsilova, V.: Structural aspects of protein kinase ASK1 regulation. *Adv Biol Regul.* 2017, 66, 31-36
- [20] Weijman, J.F., Kumar, A., Jamieson, S.A., King, C.M., Caradoc-Davies, T.T., Ledgerwood, E.C., Murphy, J.M., Mace, P.D.: Structural basis of autoregulatory scaffolding by apoptosis signal-regulating kinase 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2017, 114, 2096-2105
- [21] Bunkoczi, G., Salah, E., Filippakopoulos, P., Fedorov, O., Müller, S., Sobott, F., Parker, S.A., Zhang, H., Min, W., Turk, B.E., Knapp, S.: Structural and functional characterization of the human protein kinase ASK1. *Structure.* 2007, 15, 1215-1226
- [22] Wang, X.S., Diener, K., Tan, T.H., Yao, Z.: MAPKK6, a novel mitogen-activated protein kinase kinase kinase, that associates with MAPKKK5. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998, 253, 33-37
- [23] Kaji, T., Yoshida, S., Kawai, K., Fuchigami, Y., Watanabe, W., Kubodera, H., Kishimoto, T.: ASK3, a novel memeber of the apoptosis signal-regulating kinase family, is essential for stress-induced cell death in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2010, 395, 213-218

- [24] Shiizaki, S., Naguro, I., Ichijo, H.: Activation mechanisms of ASK1 in response to various stresses and its significance in intracellular signaling. *Adv Biol Regul.* 2013, 53, 135-144
- [25] Federspiel, J.D., Codreanu, S.G., Palubinsky, A.M., Winland, A.J., Betanzos, C.M., McLaughlin, B., Liebler, D.C.: Assembly dynamics and stoichiometry of the apoptosis signal-regulating kinase (ASK) signalosome in response to electrophile stress. *Mol Cell Proteomics.* 2016, 15, 1947-1961
- [26] Noguchi, T., Takeda, K., Matsuzawa, A., Saegusa, K., Nakano, H., Gohda, J., Inoue, J., Ichijo, H.: Recruitment of tumor necrosis factor receptor-associated factor family proteins to apoptosis signal-regulating kinase 1 signalosome is essential for oxidative stress-induced cell death. *J Biol Chem.* 2005, 280, 37033-37040
- [27] Liu, H., Nishitoh, H., Ichijo, H., Kyriakis, J.M.: Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 (ASK1) by tumor necrosis factor receptor-associated factor 2 requires prior dissociation of the ASK1 inhibitor thioredoxin. *Mol Cell Biol.* 2000, 20, 2198-2208
- [28] Goldman, E.H., Chen, L., Lu, H.: Activation of apoptosis signal-regulating kinase 1 by reactive oxygen species through dephosphorylation at serine 967 and 14-3-3 dissociation. *J Biol Chem.* 2004, 279, 10442-10449
- [29] Lu, J., Holmgren, A.: Thioredoxin system in cell death progression. *Antioxid Redox Signal.* 2012, 17, 1738-1747
- [30] Holmgren, A.: Thioredoxin. *Ann Rev Biochem.* 1985, 54, 237-271
- [31] Hanschmann, E., Godoy, J.R., Berndt, C., Hudemann, C., Lillig, C.H.: Thioredoxins, glutaredoxins, and peroxiredoxins – molecular mechanisms and health significance: from cofactors to antioxidants to redox signaling. *Antioxid Redox Signal.* 2013, 19, 1539-1605
- [32] Kosek, D., Kylarova, S., Psenakova, K., Rezabkova, L., Herman, P., Vecer, J., Obsilova, V., Obsil, T.: Biophysical and structural characterization of the thioredoxin-binding domain of protein kinase ASK1 and its interaction with reduced thioredoxin. *J Biol Chem.* 2014, 289, 24463-24474

- [33] Weichsel, A., Gasdaska, J.R., Powis, G., Montfort, W.R.: Crystal structures of reduced, oxidized, and mutated human thioredoxins: evidence for a regulatory homodimer. *Structure*. 1996, 4, 735-751
- [34] Kylarova, S., Kosek, D., Petrvalsak, O., Psenakova, K., Man, P., Vecer, J., Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T.: Cysteine residues mediate high-affinity binding of thioredoxin to ASK1. *FEBS J*. 2016, 283, 3821-3838
- [35] Freeman, A.K., Morrison, D.K.: 14-3-3 proteins: diverse functions in cell proliferation and cancer progression. *Semin Cell Dev Biol*. 2011, 22, 681-687
- [36] Gardino, A.K., Yaffe, M.B.: 14-3-3 proteins as signaling integration points for cell cycle control and apoptosis. *Semin Cell Dev Biol*. 2011, 22, 688-695
- [37] Rittinger, K., Budman, J., Xu, J., Volinia, S., Cantley, L.C., Smerdon, S.J., Gamblin, S.J., Yaffe, M.B.: Structural analysis of 14-3-3 phosphopeptide complexes identifies a dual role for the nuclear export signal of 14-3-3 in ligand binding. *Mol Cell*. 1999, 4, 153-166
- [38] Zhang, L., Chen, J., Fu, H.: Suppression of apoptosis signal-regulating kinase 1-induced cell death by 14-3-3 proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999, 96, 8511-8515
- [39] Zhang, L., Wang, H., Liu, D., Liddington, R., Fu, H.: Raf-1 kinase and exoenzyme S interact with 14-3-3 $\zeta$  through a common site involving lysine 49. *J Biol Chem*. 1997, 272, 13717-13724
- [40] Subramanian, R.R., Zhang, H., Wang, H., Ichijo, H., Miyashita, T., Fu, H.: Interaction of apoptosis signal-regulating kinase 1 with isoforms of 14-3-3 proteins. *Exp Cell Res*. 2004, 294, 581-591
- [41] Petrvalska, O., Kosek, D., Kukacka, Z., Tosner, Z., Man, P., Vecer, J., Herman, P., Obsilova, V., Obsil, T.: Structural insight into the 14-3-3 protein-dependent inhibition of protein kinase ASK1 (apoptosis signal-regulating kinase 1). *J Biol Chem*. 2016, 291, 20753-20765
- [42] Lebowitz, J., Lewis, M.S., Schuck, P.: Modern analytical ultracentrifugation in protein science: A tutorial review. *Protein Sci*. 2002, 11, 2067-2079

- [43] Cole, J.L., Lary, J.W., Moody, T., Laue, T.M.: Analytical ultracentrifugation: Sedimentation velocity and sedimentation equilibrium. *Methods Cell Biol.* 2008, 84, 134-179
- [44] Vaněk, O., Bezouška, K.: Analytická ultracentrifugace a její využití v biochemické laboratoři. *Chem listy.* 2010, 104, 1155-1162
- [45] Kikhney, A.G., Svergun, D.I.: A practical guide to small angle X-ray scattering (SAXS) of flexible and intrinsically disordered proteins. *FEBS letters.* 2015, 589, 2570-2577
- [46] Jacques, D.A., Trewhella, J.: Small-angle scattering for structural biology – expanding the frontier while avoiding the pitfalls. *Protein Sci.* 2010, 19, 642-657
- [47] Putnam, C.D., Hammel, M., Hura, G.L., Tainer, J.A.: X-ray solution scattering (SAXS) combined with crystallography and computation: defining accurate macromolecular structures, conformations and assemblies in solution. *Q Rev Biophys.* 2007, 40, 191-285
- [48] Skou, S., Gillilan, R.E., Ando, N.: Synchrotron-based small-angle X-ray scattering of proteins in solution. *Nat Protoc.* 2014, 9, 1727-1739
- [49] Petoukhov, M.V., Svergun, D.I.: Global rigid body modeling of macromolecular complexes against small-angle scattering data. *Biophys J.* 2005, 89, 1237-1250
- [50] Petoukhov, M.V., Franke, D., Shkumatov, A.V., Tria, G., Kikhney, A.G., Gajda, M., Gorba, C., Mertens, H.D.T., Konarev, P.V., Svergun, D.I.: New developments in the ATSAS program package for small-angle scattering data analysis. *J Appl Crystallogr.* 2012, 45, 342-350
- [51] Svergun, D., Barberato, C., Koch, M.H.J.: CRY SOL – a program to evaluate X-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates. *J Appl Crystallogr.* 1995, 28, 768-773
- [52] Pettersen, E.F., Goddard, T.D., Huang, C.C., Couch, G.S., Greenblatt, D.M., Meng, E.C., Ferrin, T.E.: UCSF Chimera – a visualization system for exploratory research and analysis. *J Comput Chem.* 2004, 25, 1605-1612
- [53] Holding, A.N.: XL-MS: Protein cross-linking coupled with mass spectrometry. *Methods.* 2015, 89, 54-63

- [54] Schneider, M., Belsom, A., Rappsilber, J.: Protein tertiary structure by crosslinking/mass spektrometry. *Trends Biochem Sci.* 2018, 43, 157-169
- [55] Fioramonte, M., Santos, A.M., McIlwain, S., Noble, W.S., Franchini, K.G., Gozzo, F.C.: Analysis of secondary structure in proteins by chemical crosslinking coupled to mass spectrometry. *Proteomics.* 2012, 12, 2746-2752
- [56] Götze, M., Pettelkau, J., Schaks, S., Bosse, K., Ihling, C.H., Krauth, F., Fritzsche, R., Kühn, U., Sinz, A.: StavroX—a software for analyzing crosslinked products in protein interaction studies. *J Am Soc Mass Spectrom.* 2012, 23, 79-87
- [57] Konarev, P.V., Volkov, V.V., Sokolova, A.V., Koch, M.H.J., Svergun, D.I.: PRIMUS – a Windows-PC based system for small-angle scattering data analysis. *J Appl Cryst.* 2003, 36, 1277-1282 Panjkovich, A., Svergun, D.I.: CHROMIXS: automatic and interactive analysis of chromatography-coupled small angle X-ray scattering data. *Bioinformatics.* 2018, 34, 1944-1946
- [58] Panjkovich, A., Svergun, D.I.: CHROMIXS: automatic and interactive analysis of chromatography-coupled small angle X-ray scattering data. *Bioinformatics.* 2018, 34, 1944-1946
- [59] Ortega, A., Amorós, D., Torre, J.G.: Prediction of hydrodynamic and other solution properties of rigid proteins from atomic- and residue-level models. *Biophys J.* 2011, 101, 892-898

# Příloha 1

Sekvence lidské proteinkinasy ASK1 složené z 1.374 aminokyselin. Sekvence odpovídající studovanému proteinu je zvýrazněna tučně.

```
1 ATGAGCACGGAGGCG GACGAGGGCATCACT TTCTCTGTGCCACCC TTCGCCCCCTCGGGC TTCTGCACCATCCCC
1 M S T E A D E G I T F S V P P F A P S G F C T I P
76 GAGGGCGGCATCTGC AGGAGGGGAGGAGCG GCGGCGGTGGGCGAG GCGGAGGAGCACCAG CTGCCACCGCCGCGG
26 E G G I C R R G G A A A V G E G E E H Q L P P P P
151 CCGGGCAGTTTCTGG AACGTGGAGAGCGCC GCTGCCCTGGCATC GGTGTCCGGCGGCC ACCTCCTCGAGCAGT
51 P G S F W N V E S A A A P G I G C P A A T S S S S
226 GCCACCCGAGGCCGG GGCAGCTCTGTTGGC GGGGGCAGCCGACGG ACCACGGTGGCATAT GTGATCAACGAAGCG
76 A T R G R G S S V G G G S R R T T V A Y V I N E A
301 AGCCAAGGGCAACTG GTGGTGGCCGAGAGC GAGGCCCTGCAGAGC TTGCGGGAGGCGTGC GAGACAGTGGGCGCC
101 S Q V Q L V V A E S E A L Q S L R E A C T S S S S
376 ACCCTGGAAACCTCG CATTTTGGGAAACTC GACTTTGGAGAAACC ACCGTGCTGGACCGC TTTTACAATGCAGAT
126 T L E T L H F G K L D F G E T T V L D R F Y N A D
451 ATTGCGGTGGTGGAG ATGAGCGATGCCTTC CGGACCGCTCCTTG TTTTACCACCTTGGG GTGAGAGAAAGTTTC
151 I A V V E M S D A F R Q P S L F Y H L G V R E I F
526 AGCATGGCCAACAAC ATCATCCTCTACTGC GATACTAACTCGGAC TCTCTGCAGTCACTG AAGGAAATCATTTCG
176 S M A N N I I L Y C D T N S D S L Q S L K E I I C
601 CAGAAGAATACTATG TGCAGTGGAACTAC ACCTTTGTTCCTTAC ATGATAACTCCACAT AACAAAGTCTACTGC
201 Q K N T M C T G N Y T F V P Y M I T P H N K V G A
676 TGTGACAGCAGCTTC ATGAAGGGGTGGACA GAGCTCATGCAACCG AACTTCGAGCTGCTT CTTGGACCCATCTGC
226 C D S S F M K G L T E L M Q P N F E L L L G P I C
751 TTACCTCTGTGGAT CGTTTTATTCAACTT TTGAAGGTGGCACA GCAAGTTCTAGCCAG TACTTCCGGGAATCT
251 L P L V D R F I Q L L K V A Q A S S S Q Y F R E S
826 ATACTCAATGACATC AGGAAAGCTCGTAAT TTATACACTGGTAAA GAATTGGCAGCTGAG TTGGCAAGAATTCGG
276 I L N D I R K A R N L Y T G K E L A A E L A R I R
901 CAGCAGTAGATAAT ATCGAAGTCTTGACA GCAGATATTGTCATA AATCTGTTACTTTCC TACAGAGATATCCAG
301 Q R V D N I E V L T A D I V I N L L L S A L D I Q
976 GACTATGATTCTATT GTGAAGCTGGTAGAG ACTTTAGAAAACTG CCAACCTTTGATTTC GCCTCCCATCACCAT
326 D Y D S I V K L V E T L E K L P T F D L A S H H H
1051 GTGAAGTTTCATTAT GCATTTGCACTGAAT AGGAGAAATCTCCCT GGTGACAGAGCAAAA GCTCTTGATATTATG
351 V K F H Y A F A L N R R N L P G D R A K A L D I M
1126 ATTCCCATTGGTGAA AGCGAAGGACAAGTT GCTTCAGATATGTAT TGCCTAGTTGGTCGA ATCTACAAAGATATG
376 I P M V Q S E G Q V A S D M Y C L V G R I Y K D M
1201 TTTTGGACTCTAAT TTCACGGACACTGAA AGCAGAGACCATGGA GCTTCTTGGTTCAA AAGGCATTGGAATCT
401 K T D V T V V R F P V L I L E P T K I Y Q P S Y L
1276 GAGCCAACACTACAG TCAGGAATTAATTAT GCGGTCTCTCCTCTG GCAGCTGGACACCAG TTTGAATCTTCTTTT
426 E P T L Q S G I N Y A V L L L A A G H Q F E S S F
1351 GAGTCCGGAAAGTT GGGGTGAAGCTAAGT AGTCTTCTTGGTAAA AAGGGAACTTGGA AAACCTCAGAGCTAC
451 E L R K V G V K L S S L L G K K G N L S K G S Y
1426 TGGGAAGTTGGATTT TTTCTGGGGGCCAGC GTCCTAGCCAATGAC CACATGAGAGTCATT CAAGCATCTGAAAAG
476 W E V G F F L G A S V L A N D H M R V I Q A S E K
1501 CTTTTAAACTGAAG ACACAGCATGGTAC CTCAAGTCTATTGTA GAGACAATTTTGATA TATAAGCATTTTGTG
501 L F L K T P A W Y L K S I V E T I L I Y E H F Y
1576 AAAGTGACCACAGAA CAGCCTGTGGCCAAG CAAGAACTGTGGAC TTTTGGATGGATTTC CTGGTCGAGGCCACA
526 K L T T E Q P V A K Q E L V D F W M D F L V E A T
1651 AAGACAGATGTTACT GTGGTTAGGTTTCCA GTATTAATATTAGAA CCAACCAAAATCTAT CAACCTTCTTATTTG
551 K T D V T V V R F P V L I L E P T K I Y Q P S Y L
1726 TCTATCAACAATGAA GTTGAGGAAAAGACA ATCTCTATTTTGGCAC GTGCTTCTGTATGAC AAGAAAGGTATACAT
576 S I N N E V E E K T I S I W H V L P D D K K G I H
1801 GAGTGAATTTTAGT GCCTCTTCTGTGAGG GGAGTGAGTATTTCT AAATTTGAAGAAAAG TGCTGCTTTCTTTAT
601 E W N F S A S S V R G V S I S K F E E R C C F L Y
1876 GTGCTTCACAATTCT GATGATTTCCAAATC TATTTCTGTACAGAA CTTTATTGTAAAAAG TTTTGTGAGATGGTG
626 V L H N S D D F Q I Y F C T E L H C K K F F E M V
1951 AACACATTACCGAA GAGAAGGGGAGAAGC ACAGAGGAAGGAGAC TGTGAAAGTGACTTG CTGGAGTATGACTAT
651 N T I T E E K G R S T E E G D C E S D L Y E H F Y
2026 GAATATGATGAAAAT GGTGACAGAGTCGTT TTAGGAAAAGGCACT TATGGGATAGTCTAC GCAGGTCGGGACTTG
676 E Y D E N G D R V V L G K G T Y G I V Y A G R D L
2101 AGCAACCAAGTCAGA ATTGCTATTAAGGAA ATCCAGAGAGAGAC AGCAGATACTCTCAG CCCCTGCATGAAGAA
701 S N Q V R I A I K E I P E R D S R Y S Q P L H E A
2176 ATAGCATTCATATAA CACCTGAAGCACAAA AATATTGTCCAGTAT CTGGGCTCTTTTCAGT GAGAATGGTTTCATT
726 I A L H K H L K H K N I V Q Y L G S F S E N G F I
2251 AAAATCTTCATGGAG CAGGTCCCTGGAGGA AGTCTTCTGTCTCTC CTTCGTTCCAAATGG GGTCCATAAAAGAC
751 K I F M E Q I F G G S L S A L F L R S K W G P L K D
2326 AATGAGCAAAACAATT GGCTTTTATACAAAG CAAATACTGGAAGGA TAAAAATATCTCCAT GACAATCAGATAGTT
776 N E Q T I G F Y T K Q I L E G L K Y L H D N Q I V
2401 CACCGGGACATAAAG GGTGACATGTGTTG ATTAATACCTACAGT GGTGTTCTCAAGATC TCTGACTTCGGAACA
```



801 H R D I K G D N V L I N T Y S G V L K I S D F G T  
 2476 TCAAAGAGGCTTGCT GGCATAAACCCCTGT ACTGAAACTTTTACT GGTACCCTCCAGTAT ATGGCACCAGAAATA  
 826 S K R L A G I N P C T E T F T G T L Q Y M A P E I  
 2551 ATAGATAAAGGACCA AGAGGCTACGGAAAA GCAGCAGACATCTGG TCTCTGGGCTGTACA ATCATTGAAATGGCC  
 851 I D K G P R G Y G K A A D I W S L G C T I I E M A  
 2626 ACAGGAAAACCCCA TTTTATGAACTGGGA GAACCACAAGCAGCT ATGTTCAAGGTGGGA ATGTTTAAAGTCCAC  
 876 T G K P P F Y E L G E P Q A A M F K V G M F K V H  
 2701 CCTGAGATCCCAGAG GCCATGTCTGCAGAG GCCAAGGCATTTCATA CTGAAATGTTTTGAA CCAGATCCTGACAAG  
 901 P E I P E S M S A E A K A F I L K C F E P D P D K  
 2776 AGAGCCTGTGCTAAC GACTTGCTTGTTGAT GAGTTTTTAAAAAGTT TCAAGCAAAAAGAAA AAGACACAACCTAAG  
 926 R A C A N D L L V D E F L K V S S K K K K T Q P K  
 2851 CTTTCAGTCTTTCA GTGGATCAAATGAA TATCTCAGGAGTATA TCCTTGCCGGTACCT GTGCTGGTGGAGGAC  
 951 L S A L S A G S N E Y L R S I S L P V P V L V E D  
 2926 ACCAGCAGCAGCAGT GAGTACGGCTCAGTT TCACCCGACACGGAG TTGAAAGTGGACCCC TTCTCTTTCAAACA  
 976 T S S S S E Y G S V S P D T E L K V D P F S F K T  
 3001 AGAGCAAGTCTTGC AGGAGAAAGAGATGTC AAGSGAATTCGGACA CTCTTTTGGGCGATT CTCTTTTGGGCAATTTT  
 1001 R A K S C G E R D V K G I R T L F L G I P D E N F  
 3076 GAAGATCACAGTGCT CCTCCTTCCCCTGAA GAAAAAGATTCTGGA TTCTTCATGCTGAGG AAGGACAGTGAGAGG  
 1026 E D H S A P P S P E E K D S G F F M L R K D S E R  
 3151 CGAGTACCCTTAC AGGATCCTGACGGAA GACCAAGACAAAATT GTGAGAAACCTAATG GAATCTTTGAGCTCAG  
 1051 R A T L H R I L T E D Q D K I V R N L M E S L A Q  
 3226 GGGGCTGAAGAACCG AAATAAAATGGGAA CACATCACAAACCTC ATTGCAAGCCTCAGA GAATTTGTGAGATCC  
 1076 G A E E P K L K W E H I T T L I A S L R E F V R S  
 3301 ACTGACCGAAAAATC ATAGCCACACACTG TCAAAGCTGAAACTG GAGCTGGAATTCGAC AGCCATGGCATTAGC  
 1101 T D R K I I A T T L S K L K L E L D F D S H G I S  
 3376 CAAGTCCAGGTGGTA CTCTTTGGTTTTCAA GATGCTGTCAATAAA GTTCTTCGGAATCAT AACATCAAGCCGCAC  
 1126 Q V Q V V L F G F Q D A V N K V L R N H N I K P H  
 3451 TGGATGTTTGCCTTA GACAGTATCATTGCG AAGGCGGTACAGACA GCCATTACCATCTG GTTCCAGAATAAGG  
 1151 W M F A L D S I I R K A V Q T A I T I L V P E L R  
 3526 CCACATTTGAGCCTT GCATCTGAGAGTGAT ACTGCTGATCAAGAA GACTTGGATGTAGAA GATGACCATGAGGAA  
 1176 P H F S L A S E S D T A D Q E D L D V E D D H E E  
 3601 CAGCCTTCAAATCAA ACTGTCCGAAGACCT CAGGCTGTCATTGAA GATGCTGTGGCTACC TCAGGCGTGAGCAG  
 1201 Q P S N Q T V R R P Q A V I E D A V A T S G V S T  
 3676 CTCAGTTTACTGTG TCTCATGATTCCCAG AGTGCTACCGGTCA CTGAATGTACAGCTT GGAAGATGAAAATA  
 1226 L S S T V S H D S Q S A H R S L N V Q L G R M K I  
 3751 GAAACCAATAGATTA CTGGAAGAATTGGTT CGGAAAGAGAAAAGAA TTACAAGCACTCCTT CATCGAGCTATTGAA  
 1251 E T N R L L E E L V R K E K E L Q A L L H R A I E  
 3826 GAAAAAGACCAAGAA ATTAAACACCTGAAG CTTAAGTCCCAACCC ATAGAAATTCCTGAA TTGCCTGTATTTTAT  
 1276 E K D Q E I K H L K L K S Q P I E I P E L P V F H  
 3901 CTAATTTCTTCTGGC ACAAATACTGAAGAT TCTGAACCTACCGAC TGGCTGAGAGTGAAT GGAGCTGATGAAGAC  
 1301 L N S S G T N T E D S E L T D W L R V N G A D E D  
 3976 ACTATAAGCCGGTTT TTGGCTGAAGATTAT AACTATTGGATGTT CTCTACTATGTTACA CGTGATGACTTAAAA  
 1326 T I S R F L A E D Y T L L D V L Y Y V T R D D L K  
 4051 TGCTTGAGACTAAGG GGAGGGATGCTGTGC AACTGTGGAAGGCT ATCATTGACTTTTGA AACAAACAGACTTGA  
 1351 C L R L R G G M L C T L W K A I I D F R N K Q T \*

Svoluji k zapůjčení této práce pro studijní účely a prosím, aby byla řádně vedena evidence vypůjčovatelů.

<b>Jméno, příjmení adresa</b>	<b>Číslo OP</b>	<b>Datum</b>	<b>Poznámka</b>